



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA**

**Cultivo *in vitro* de *Ortegocactus  
macdougallii* Alexander cactácea endémica  
del estado de Oaxaca**

**TESIS**

Que para obtener el título de

**Biólogo**

**P R E S E N T A**

Vázquez Castro Oscar Emmanuel

**DIRECTOR DE TESIS**

Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz,  
Estado de México 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta investigación se llevó a cabo en Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila

Agradecimiento:

Agradezco el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) DGAPA, UNAM por el financiamiento al Proyecto PAPIIT IT201020 “Cultivo in vitro de agaves de interés comercial como alternativa para su conservación y aprovechamiento”; ya que con los recursos aportados hicieron posible la disponibilidad de diversos materiales, reactivos y servicios que no había en el Laboratorio para el desarrollo de la presente tesis.

**A mis abuelos<sup>†</sup> y abuelas<sup>†</sup> sin ustedes no sería lo que soy.**

## **Agradecimientos**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, el estudiar en ti fue un sueño logrado, donde la diversidad de pensamientos, vivencias, experiencias formaron al profesionalista que soy hoy.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, mi segundo hogar donde fui libre y quien me dio a algunas de las personas que estuvieron, están y estarán en mi corazón, pensamientos y mi alma.

Al Dr. Víctor por no solo ser asesor y guía en este camino, sus enseñanzas fueron y serán más allá de lo académico.

Al Doctores Hugo Perales, al Doctor Gerardo Ortiz, a la Doctora Lucí y al Maestro Octavio por sus valiosas observaciones en la revisión de este documento.

A todas las personas que me acompañaron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, su calidez y fraternidad fue una motivación para continuar con el desarrollo de este proyecto, Ale, Alo, Aura, Adri, Barbarita, Wendy, Octavio gracias.

A los miembros de mi Jurado, gracias por sus valiosas observaciones que enriquecieron este documento.

A todos mis profesores de la FESI, en ustedes encontré que el amor por la Biología viene en todas sus presentaciones y en todas las formas de vida que estudian.

A Iraís gracias por ser mi confidente, por ser la persona que siempre está para escucharme, para guiarme, motivarme y no dejarme caer.

A Karina por ser esa amiga que está, apoya y aconseja, el recorrer juntos la licenciatura fue determinante en mi crecimiento personal y académico.

A Nahomi sin ti y sin todas esas aventuras que tuvimos, mi paso por la carrera hubiera ocurrido de manera muy distinta, ocupas un lugar muy especial en mi corazón.

A Elena, por ser la amiga de toda mi vida, por recorrer todo nuestro desarrollo académico, por permitirme ser parte de tu vida y darme un sobrino que no es de sangre.

A Anyp gracias por tu amistad y por tardes llenas de risas en el laboratorio y por toda la Ciudad Universitaria.

A la SPD, Anai, Armando, Carlos, Antonio, sus consejos, su presencia y saber que siempre podré contar con ustedes me motiva a luchar por mis sueños.

A aquellos con los que compartí una tarde de amigos, una visita a los gises, si los nombraré a todos no terminaría nunca, ustedes saben que siempre contarán con un amigo y confidente leal.

A mi papá y mamá, por todo el esfuerzo y lucha que hicieron por darme todos estos años de estudio, nunca terminaré de agradecerles, todo lo que me dieron para lograr esto, esto es tanto de ustedes como mío, son un ejemplo de persistencia y fuerza, los amo mucho.

Al Doctor Manuel Mandujano por su valioso aporte en el análisis estadístico y a Toño por la paciencia de explicarme.

A mis hermanos, Luis, David, Ricardo, gracias por motivarme a continuar y nunca rendirme.

A todos los que estuvieron y ya no están, no dejo de pensar en ustedes, marcaron mi vida de una manera que no lo puedo explicar, gracias a la vida por ponerlos en mi vida, pero no agradezco que me los haya quitado, los llevaré siempre conmigo.

A todos mis compañeros de la Fuente, toda la motivación que me dieron para poder terminar este escrito no tengo manera de agradecerles, en especial a Laura, Abel, Farid, Diego, Coro.

# ÍNDICE

<b>Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>Antecedentes.....</b>	<b>5</b>
<b>Biodiversidad en el mundo y en México .....</b>	<b>5</b>
<b>La familia Cactaceae y su presencia en México.....</b>	<b>6</b>
<b>La familia Cactaceae en la actualidad.....</b>	<b>7</b>
<b>Clasificación taxonómica de <i>Ortegocactus macdougallii</i> Alexander .....</b>	<b>10</b>
<b>Descripción botánica de <i>Ortegocactus macdougallii</i> .....</b>	<b>11</b>
<b>Estado actual de <i>Ortegocactus macdougallii</i>.....</b>	<b>14</b>
<b>Cultivo de Tejidos Vegetales .....</b>	<b>16</b>
<b>Medios de cultivo.....</b>	<b>20</b>
<b>Auxinas .....</b>	<b>20</b>
<b>Citocininas .....</b>	<b>21</b>
<b>Meristemos y dominancia apical.....</b>	<b>23</b>
<b>Cultivo in vitro de cactáceas .....</b>	<b>24</b>
<b>Cultivo de Tejidos Vegetales en <i>Ortegocactus macdougallii</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>Justificación .....</b>	<b>28</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>30</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>35</b>
<b>Respuestas morfogénicas .....</b>	<b>35</b>
<b>Aclimatización .....</b>	<b>48</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>64</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>65</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>68</b>
<b>Apéndice.....</b>	<b>78</b>

## Figuras

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<i>Figura 1. Los cinco países con mayor diversidad de plantas vasculares (CAT-CONABIO) (Sarukhán et al., 2017).....</i>	5
<i>Figura 2. Algunas familias de plantas vasculares en México con alta proporción de endemismos (CAT-CONABIO) (Sarukhán et al., 2017).....</i>	6
<i>Figura 3. Dibujos esquemáticos de lo flor, el fruto y la semilla de <i>Ortegocactus macdougallii</i>. ....</i>	12
<i>Figura 4. A) Hábitat natural de <i>Ortegocactus macdougallii</i> Oaxaca .....</i>	13
<i>Figura 5. Costo de semillas de <i>O. macdougallii</i> (Captura de pantalla tomada de <a href="https://africa-seeds.com/products/ortegocactus-macdougallii-7-pcs-seeds">https://africa-seeds.com/products/ortegocactus-macdougallii-7-pcs-seeds</a>).....</i>	15
<i>Figura 6. Las células madre generan células hijas, algunas de las cuales permanecen no determinadas y mantienen las propiedades de las células madre, mientras las demás se determinan y llegan a diferenciarse (Tomado de Taíz y Zeiger, 2006).....</i>	23
<i>Figura 7. Plántulas germinadas en condiciones in vitro en el laboratorio de CTV Jardín Botánico, IBUNAM. ....</i>	30
<i>Figura 8. Explantes de <i>O. macdougallii</i>. A) Se observa detalle de cada explante de Tallo cada uno con 8-12 areolas; B) Se observa que se sembraron dos explantes por frasco.....</i>	31
<i>Figura 9. Proceso de aclimatización: A) Planta de <i>O. macdougallii</i> con dos días de haber iniciado la aclimatización in vitro; B) Plantas cultivadas in vitro previo a ser sacadas del frasco; C) Plantas fuera del frasco, se observa que algunas plantas generaron brote. ....</i>	33
<i>Figura 10. Diagrama general de la metodología experimental del cultivo de tallos de <i>O. macdougallii</i> ...</i>	34
<i>Figura 11. Cultivo in vitro de tallo de <i>O. macdougallii</i> del tratamiento 1; 1.0/0.4 mg/L (BAP/ANA).....</i>	36
<i>Figura 12. Cultivo in vitro de tallo de <i>O. macdougallii</i> del tratamiento 2 (1.5/0.4 mg/L (BAP/ANA)): .....</i>	38
<i>Figura 13. Cultivo in vitro de tallo de <i>O. macdougallii</i> en el tratamiento 3 (2.0/0.4 mg/L (BAP/ANA)):....</i>	40
<i>Figura 14. Cultivo in vitro de tallo de <i>O. macdougallii</i> en el tratamiento 4 (3.0/0.8 mg/L (BAP/ANA)): ....</i>	42
<i>Figura 15. Distintos momentos del cultivo in vitro de tallo de <i>O. macdougallii</i> en el grupo control .....</i>	45
<i>Figura 16. Plántulas de <i>O. macdougallii</i> cultivadas in vitro fuera sus frascos. ....</i>	50
<i>Figura 17. Plantas del grupo Control.....</i>	51
<i>Figura 18. Plantas aclimatizadas con una disminución de sales al 25% en el Medio de cultivo in vitro.....</i>	52
<i>Figura 19. Plantas aclimatizadas de la prueba en un medio con 10 g/L de sacarosa.....</i>	53
<i>Figura 20. . Plantas de <i>O. macdougallii</i> de la prueba en un medio MS 25% adicionado con 10g/L de sacarosa. ....</i>	54

## Cuadros

Cuadro	Página
<i>Cuadro 1. Algunos reportes de cultivo de tejidos en la familia Cactaceae. ....</i>	25
<i>Cuadro 2. Promedio de rangos para la Prueba de Kruskal-Wallis.....</i>	46
<i>Cuadro 3. Cultivo in vitro de O. macdougallii, después de 52 semanas de iniciada la inducción.....</i>	47
<i>Cuadro 4. Resultados de la aclimatización con 44 semanas in vitro y 8 semanas ex vitro .....</i>	55

## Gráficos

Gráfico	Página
<i>Gráfico 1. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de O. macdougallii en el tratamiento 1 (1.0/0.4 mg/L (BAP/ANA)). ....</i>	37
<i>Gráfico 2. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de O. macdougallii en el tratamiento 2 (1.5/0.4 mg/L (BAP/ANA)). ....</i>	39
<i>Gráfico 3. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de O. macdougallii en el tratamiento 3 (2.0/0.4 mg/L (BAP/ANA)). ....</i>	41
<i>Gráfico 4. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de O. macdougallii en el tratamiento 4 (3.0/0.8 mg/L (BAP/ANA)). ....</i>	43
<i>Gráfico 5. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de O. macdougallii en el grupo control.....</i>	44
<i>Gráfico 6. Conteo final de brotes después de 52 semanas de iniciada la inducción en los distintos tratamientos del cultivo in vitro de tallos de O. macdougallii.....</i>	47
<i>Gráfico 7. Porcentaje de brotes enraizados por tratamiento después de 52 semanas de iniciada la inducción. ....</i>	48
<i>Gráfico 8. Porcentaje de plantas sobrevivientes después de dos meses de iniciada la aclimatización .....</i>	54

## Abreviaturas

**μM:** Micromolar

**2iP:** 2-Isopenteniladenina

**A:** Amenazada

**AIA:** Ácido indol-3-acético

**ANA:** Ácido α-naftalenacético

**BAP-BA:** 6-Bencilaminopurina

**CFL:** Campana de Flujo Laminar

**CITES:** Convención sobre el comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre

**CO<sub>2</sub>:** Dióxido de Carbono

**Covid-19:** Coronavirus 2019

**CTV:** Cultivo de Tejidos Vegetales

**DOF:** Diario Oficial de la Federación

**g/L:** gramos por litro

**IBA- AIB:** Ácido indol-3-butirico

**IB-UNAM:** Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México

**IUCN:** Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza

**KIN:** Kinetina

**mg/L:** miligramos por litro

**MS:** Medio de Cultivo Murashige y Skoog 1962

**MXN:** Pesos mexicanos

**NOM-059-SEMARNAT-2010:** Norma Oficial Mexicana

**RCV:** Reguladores de Crecimiento Vegetal

**SEMARNAT:** Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales

## Resumen

*Ortegocactus macdougallii* (Cactaceae) es endémica del estado de Oaxaca, su situación ambiental de acuerdo con la SEMARNAT y su NOM-059 le asignaron la categoría de amenazada, debido principalmente a actividades antropogénicas, la destrucción de su hábitat, efectos del cambio climático y el saqueo con fines comerciales. La CITES la incluye en su Apéndice II, con lo cual se regula su comercio internacional, la UICN no la incluye en su lista roja porque no se tiene información suficiente del estado de su población. Su situación se agudiza en virtud de la falta de conocimiento de la especie y a su limitada distribución en una sola población, lo que hace cercana su posible extinción; y no obstante de su valor ecosistémico, su potencial económico es poco aprovechado, al ser una planta muy apreciada entre los coleccionistas. Poco o nada se cultiva y no hay un programa activo para su conservación, por lo que es necesario descubrir y desarrollar medidas que permitan la no desaparición de esta especie. El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) ha demostrado ser una alternativa para la propagación y conservación de especies en peligro de extinción. En el presente estudio fue posible establecer las condiciones experimentales que permitieron la propagación *in vitro* de *O. macdougallii*. A partir de 15 plántulas germinadas *in vitro* (20 mm altura) se cultivaron asépticamente secciones longitudinales de tallo en medio MS con distintos tratamientos: Control y BAP/ANA (1/0.4; 1.5/0.4; 2/0.4 y 3/0.8 mg/L). A dos semanas de iniciados los cultivos aparecieron los primeros brotes a partir de yemas axilares, en el tratamiento con la mayor concentración de RCV. Después de realizar dos subcultivos el número total de brotes que generaron los distintos tratamientos ascendió a 270 brotes, después del periodo de proliferación el tratamiento que regeneró el mayor número de brotes fue el que tenía la mayor concentración de RCV, pero la gran mayoría de éstos presentaron un alto grado de hiperhidratación, el tratamiento control fue el segundo con el mayor número de regenerantes sin el uso de RCV, pero fue el que presentó el menor porcentaje de brotes enraizados considerando el número de brotes individualizados. El tratamiento 2 (1.5/0.4 de BAP/ANA) fue el que logró el 100% de brotes enraizados, pero el que generó el menor número de brotes con tan solo 27. De acuerdo con los resultados obtenidos en

esta investigación es en el tratamiento 1 (1.0/0.4 mg/L BAP/ANA) en el que se obtuvieron los mejores resultados de propagación de esta especie., debido a que éste generó 67 brotes de los cuales enraizaron 60. Para lograr el enraizamiento de los brotes generados no fue necesaria la adición de algún RCV, debido a que dos semanas después de la individualización generaron raíz de manera espontánea. Al término de la etapa de enraizamiento de esta investigación se generaron un total de 270 brotes, de los cuales 156 enraizaron convirtiéndose en plantas completas, a partir de 15 plántulas que fueron disectadas. Para la aclimatización de las plantas se seleccionaron 40 plantas de entre todos los tratamientos, para realizar pruebas con la reducción de sales, reducción de la fuente de carbono, la combinación de ambos y el grupo control, en medio MS, (10 plantas por prueba) después de 11 meses de que éstas se mantuvieran en la cámara de incubación, fueron colocadas en charolas con sustrato y a las 8 semanas de estar en condiciones de invernadero el tratamiento que presentó el mayor porcentaje de plantas sobrevivientes fue en donde se le redujo la concentración de sales al medio MS al 25%. Se establecieron las condiciones experimentales para la propagación in vitro de *O. macdougallii* y su aclimatización en condiciones de invernadero. El CTV es una alternativa biotecnológica que hace posible el estudio, la propagación, conservación y la propuesta de acciones de aprovechamiento sustentable de ésta y otras especies amenazadas.

Palabras clave: Propagación, conservación, Cultivo de Tejidos, cactus.



## Introducción

La biodiversidad según Wilson (1988) se refiere a todas las formas en que la vida se manifiesta en la Tierra; en su sentido más amplio, la biodiversidad no se limita al número de especies que han existido en la historia de la vida, sino que también incluye desde la variación genética en individuos y poblaciones, hasta la diversidad de ecosistemas, entendiendo éstos como un conjunto de organismos y su medio físico interactuando en un lugar (Armenteras *et al.*, 2016).

A nivel global, de los más de 180 países reconocidos por el Banco Mundial (2017), tan sólo 17 son llamados Megadiversos debido a que, en conjunto, albergan entre el 65 y 70% del total de las especies registradas mundialmente (Mittermeier *et al.*, 1997). México forma parte de este grupo, ya que posee una gran diversidad fisiográfica y una gran riqueza biológica debido a su ubicación y compleja topografía (Soberón-Mainero *et al.*, 1994). México se ubica dentro de los cuatro primeros lugares de plantas vasculares, se han descrito poco más de 25 000 de un total que se estima entre 27 000 y 30 000, de las cuales una alta proporción es endémica del país (Sarukhán *et al.*, 2017).

En este grupo, México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en número de endemismos (Sarukhán *et al.*, 2017), ya que cerca del 42% de la flora es propia o endémica del territorio mexicano (Sosa De-Nova y Vásquez-Cruz, 2018) y se concentran principalmente en las zonas áridas y semiáridas del país (Rzedowski, 2006).

Un claro ejemplo de estas plantas es la familia Cactácea, endémica del Continente Americano, la cual agrupa cerca de 2000 especies, de las cuales México posee 669 con cerca de 70% de endemismos (Hernández *et al.*, 2007) y se considera como su principal centro de diversificación por cuanto posee la mayor riqueza tanto a nivel genérico como específico (Bravo-Hollis y Sánchez Mejorada, 1991). Las cactáceas habitan principalmente ambientes áridos en donde la vegetación es escasa los animales (roedores, murciélagos, aves, reptiles y gran número de insectos) encuentran en las cactáceas refugio o una fuente de alimento, además de que algunas de las

especies de gran tamaño funcionan como “islas de fertilidad” de las zonas secas (Jiménez-Sierra, 2011).

Sin embargo, el uso que se les ha dado a las cactáceas ha propiciado que su estado de conservación haya empeorado en los últimos años, a pesar de que existe una legislación en el país en la que se recomendó su protección desde 1930. Las cactáceas se han incluido en listados para su protección a nivel nacional e internacional, tales como la NOM-059-SEMARNAT-2010, la lista roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), y la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Flora y Fauna Silvestre (CITES).

*Ortegocactus macdougallii* es una cactácea endémica del estado de Oaxaca, México (Guzmán *et al.*, 2003), descubierta en el invierno de 1951-1952 por el señor Francisco Ortega, ayudante de Don Thomas Macdougall y descrita por Alexander en 1961 (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991; Norbert, 2013), se encuentra dentro de la NOM-059-SEMARNAT-2010 catalogada como amenazada, la IUCN no tiene datos suficientes de la especie debido a su restringida distribución porque solo se conoce una sola población (Goettsch, 2017), además se incluye en el Apéndice II de CITES.

Los cactus están sometidos a presiones cada vez mayores a causa de la actividad humana; más de la mitad de las especies de cactus son utilizadas por las personas, el comercio ilegal de plantas vivas y semillas para la industria hortícola y las colecciones privadas, así como su explotación no sostenible, constituyen las principales amenazas para estas plantas. Otras de las actividades humanas que amenazan la existencia de las cactáceas es la ganadería, la cual afecta al 31% de las especies amenazadas, la agricultura afecta al 24%, el desarrollo residencial y comercial, la explotación de canteras y la acuicultura, son otras de las actividades que influyen en la conservación de este grupo de plantas (IUCN, 2015).

Al igual que a muchas otras cactáceas, las presiones que ejercen las actividades humanas, la degradación del suelo, la recolección excesiva de frutos, semillas,

plántulas y plantas adultas que son colectadas por sus rasgos morfológicos únicos, (flores amarillas, tamaño pequeño y color verde oliva del tallo) ha propiciado que *O. macdougallii* se incluya en las listas de protección, otro de los problemas que enfrenta esta cactácea es debido a su biología con una tasa lenta de crecimiento, baja germinación, y la autoincompatibilidad, dando como resultado una baja producción de frutos y semillas, aunado a la baja supervivencia en su hábitat (Arellano y Estrada-Luna, 2012).

La propagación para el comercio de esta especie es poco reportado, pocos son los lugares que cuentan con los permisos necesarios para su reproducción y venta de manera legal, las semillas de esta especie se cotizan en el mercado internacional en altos costos (35 dólares un lote de siete semillas, en <https://africa-seeds.com/products/ortegocactus-macdougallii-7-pcs-seeds>), o una planta de pocos centímetros de altura con un costo de \$290 pesos mexicanos, en 2018 la Tienda Tigridia del Jardín Botánico del Instituto de Biología puso en adopción un lote de 200 plantas con una cuota de recuperación de \$120 por planta.

Debido a la importancia biológica y económica que tiene esta especie y en general la familia Cactaceae, es necesario su estudio para la generación de diversos sistemas de propagación, adquiriendo una gran importancia como alternativas potenciales para su conservación y aprovechamiento sustentable (Fay, 1993).

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) es una ciencia, rama de la Biología y de la Biotecnología, es una herramienta altamente usada, debido a que posee un amplio rango de posibilidades en la investigación: para conocer los procesos de desarrollo de las plantas, funcionalidad en el estudio de genes, la micropropagación de plantas comerciables, la generación de plantas transgénicas con un uso específico en la industria o en la agricultura, la eliminación de virus para obtención de plantas saludables y de alta calidad, la conservación de germoplasma y el rescate de especies vegetales extintas o amenazadas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Sin duda la micropropagación es una de las aplicaciones comerciales más usadas en el cultivo de tejidos, esta técnica puede ser aplicada para la gran mayoría de especies de plantas, pero su uso es recomendado solo para lo que es económicamente rentable, entre las especies que son micropropagadas, las ornamentales ocupan el primer lugar. La micropropagación puede ocurrir de tres distintas maneras: (1) mediante la activación de yemas de nudos apicales o axilares, para la formación de brotes y su enraizamiento; (2) mediante la inducción adventicia de brotes y su enraizamiento; (3) la formación somática de embriones, maduración y germinación (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2018).

Se ha demostrado la capacidad que tiene la micropropagación por CTV en una escala comercial, pero esto no debería limitar su aplicación a especies que se encuentran en riesgo de extinción o especies escasas en la naturaleza, como lo es *O. macdougallii*, antes de que sea demasiado tarde y desaparezcan.

## Antecedentes

### Biodiversidad en el mundo y en México

La biodiversidad se refiere a la gran variedad de seres vivos sobre la Tierra y los patrones naturales que la conforman, esto comprende también la gama de ecosistemas, de especies y de sus poblaciones, así como las diferencias genéticas entre los individuos que las constituyen (Jiménez *et al.*, 2010). Los conteos recientes arrojan cerca de 1.5 millones de especies descritas, sin embargo, se estima que el número total en el mundo es alrededor de 7 millones (Dirzo y Mendoza, 2008). Esta diversidad biológica no está distribuida de manera homogénea en el planeta, es por ello que las naciones más grandes no son las más diversas (Jiménez *et al.*, 2010).

Dos terceras partes de la biodiversidad mundial se localizan en poco más de una docena de países conocidos como Megadiversos, en donde México se coloca en el cuarto lugar, en cuanto a riqueza de especies. Esta gran diversidad se debe a que el país se encuentra en la unión de dos zonas biogeográficas, la Neártica y la Neotropical, aunado a esto en México se presentan casi todos los climas del planeta debido a su accidentada topografía y compleja geología lo que permite que se desarrollen prácticamente todos los ecosistemas terrestres (Sarukhán *et al.*, 2017).

Dentro de toda esa diversidad, el país se ubica dentro de los cuatro primeros con respecto a la diversidad de plantas vasculares (Fig. 1), ya que se han descrito poco más de 25 000 de un total que se estima entre 27 000 y 30 000, de las cuales una alta proporción es endémica (Sarukhán *et al.*, 2017).

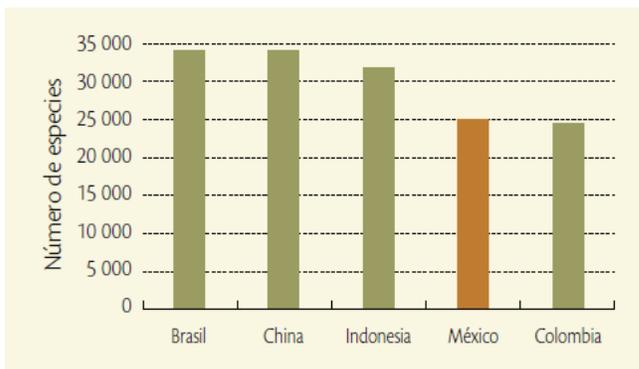


Figura 1. Los cinco países con mayor diversidad de plantas vasculares (CAT-CONABIO) (Sarukhán *et al.*, 2017)

De acuerdo con Villaseñor en 2016, la mayoría de las especies de plantas vasculares (15 306) se ubican dentro de 25 familias, en donde las cactáceas se colocan en el puesto número 7 con 677 especies. La familia Cactaceae es la cuarta con la mayor proporción de endemismos en México, solo por debajo de Zamiaceae, Crassulaceae y Asparagaceae (Fig 2.) (Sarukhán *et al.*, 2017).

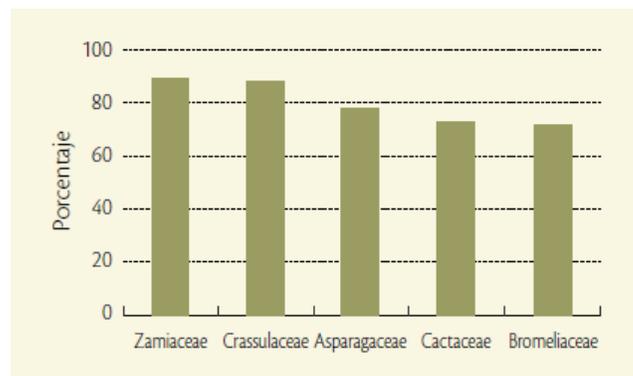


Figura 2. Algunas familias de plantas vasculares en México con alta proporción de endemismos (CAT-CONABIO) (Sarukhán *et al.*, 2017).

### La familia Cactaceae y su presencia en México

La familia Cactaceae es uno de los grupos vegetales más representativos del país, debido a que México posee la mayor diversidad de especies en el mundo con 677 (Villaseñor, 2016).

Algunas de las regiones con mayor diversidad de cactáceas en México son el valle de Tehuacán-Cuicatlán en los estados de Puebla y Oaxaca, el altiplano potosino y sur de Nuevo León, los valles de Hidalgo y Querétaro y los bosques espinosos y deciduos de Tehuantepec (Oaxaca), zonas en donde predominan las regiones áridas o semiáridas (Becerra, 2000).

Los cactus han desarrollado adaptaciones que les permiten afrontar las condiciones climáticas en donde crecen. La gran mayoría de estas adaptaciones (morfológicas y

fisiológicas) están basadas en el hecho de que estas plantas tienen que hacer un uso eficiente del agua. La forma globosa y robusta les permite almacenar este líquido al igual que disminuye la superficie expuesta al sol, la cutícula impermeable impide la pérdida de agua por transpiración, presentan metabolismo CAM como mecanismo de fotosíntesis, lo que les permite realizarla con desfase de tiempo, por las noches abren sus estomas para realizar el intercambio gaseoso (cuando las temperaturas son menores), y el dióxido de carbono es almacenado en los tejidos en forma de ácidos orgánicos mientras que durante el día ocurre la síntesis de carbohidratos utilizando el carbono almacenado (Becerra, 2000).

Hay tres caracteres estructurales únicos para esta familia: (1) presencia de areolas, (2) el meristemo apical de la rama está organizado en cuatro zonas distintivas y (3) un ovario sumido en el receptáculo, la areola es el carácter más evidente, son pequeños braquiblastos donde los nudos están completamente reducidos, cubiertos por una capa de tricomas multicelulares, por lo tanto, son grupos de meristemas que dan origen a flores por lo tanto a frutos y nuevos brotes (Anderson, 2001; Nobel, 2002).

El uso de las cactáceas en México es muy variado y se remonta a épocas previas a la llegada de los españoles. El consumo de los tallos y los frutos como alimento es, probablemente una de las costumbres con mayor antigüedad, sin embargo, hay especies a las que se les dio una utilidad medicinal o como fuente de materias primas para la elaboración de armas de caza o de pesca. Algunas tuvieron una función ceremonial como el caso del peyote (*Lophophora williamsii*) (Becerra, 2000).

### **La familia Cactaceae en la actualidad**

De acuerdo con Jiménez en 2001, las perturbaciones antropogénicas en las zonas desérticas son muchas y su intensidad se ha acentuado con el incremento de la población humana, en primer lugar, el cambio de usos de suelo provoca que los ambientes naturales sean completamente transformados, en áreas agrícolas, ganaderas o con fines urbanos (Jiménez, 2001).

En segundo lugar, la introducción de especies exóticas también ha sido causante de la desaparición de muchas especies nativas. La llegada de diversos tipos de ganado desde la época colonial a los ecosistemas desérticos ha propiciado la desaparición de las especies más vulnerables (Challenger, 1998; Jiménez, 2001).

En tercer lugar, muchas cactáceas están sujetas a colecta directa, debido a que ofrecen algún beneficio al hombre y han sido utilizadas como forraje para el ganado, como combustible y para la obtención de alimento para la población humana, ya que los tallos, pencas (nopales) y los frutos (tunas, chilitos, pitayas, pitahayas) son utilizados en la cocina mexicana. Algunas son buscadas y utilizadas como materias primas, mientras que otras son empleadas para la construcción o fabricación de artesanías. Una de las actividades que ha llevado a poner en riesgo a muchos cactus es el tráfico ilegal, debido a que los coleccionistas llegan a apreciar a algunos organismos debido a su rareza poniéndoles un alto precio (Jiménez, 2001).

Las actividades humanas como el cambio en el uso de suelo y la extracción directa de plantas de su ambiente son las causas principales que afectan adversamente a numerosas especies de cactáceas, desde hace varias décadas (Sánchez-Mejorada, 1982; Anderson *et al.*, 1994; Oldfield, 1997).

Además, a toda la actividad antropogénica, se tiene que añadir la estrecha distribución, la baja cantidad de individuos en las poblaciones naturales y sobre todo la escasez de numerosas especies, lo cual determina el nivel de rareza (Rabinowitz *et al.*, 1986). Además, sus procesos biológicos como lento crecimiento y ciclos de vida muy largos (Mandujano *et al.*, 2001; Valverde y Zavala-Hurtado, 2006).

La protección de las cactáceas en México como recurso natural tiene cerca de 81 años, periodo en el cual instancias federales, estatales, municipales, organizaciones no gubernamentales, académicos y amantes de las cactáceas han colaborado para tratar de mejorar un marco teórico y práctico para conservarlas y aprovecharlas (Bárcenas, 2006).

La legislación mexicana en materia de recursos naturales prohíbe el comercio de ejemplares, partes o sus derivados colectados directamente de sus hábitats para su venta o comercialización, pero permite con las autorizaciones adecuadas la colecta de un reducido número de ejemplares para su propagación y posterior comercialización (Bárceñas, 2006). En algunas especies este aprovechamiento ha funcionado, debido a que los ejemplares silvestres se mantienen protegidos, el conseguir un ejemplar joven de algunos de estos organismos se ha vuelto sencillo y a un bajo costo, por lo que se cree que esta política funciona de cierta manera, pero aún hay especies que su aprovechamiento es ilícito y los que se encuentran en vida silvestre siguen en riesgo de desaparecer, como es el caso del peyote (*Lophophora* spp.).

La NOM-059-SEMARNAT-2010 es la mayor autoridad que tiene por objeto identificar las especies o poblaciones de flora y fauna silvestres en riesgo en la República Mexicana, así como asignar alguna categoría de riesgo para las especies dentro de sus listados (Las categorías a las que se refiere la NOM son: (1) probablemente extinta en el medio silvestre, (2) en peligro de extinción, (3) amenazadas o (4) sujetas a protección especial) (DOF, 2010). Dentro de esta norma, se incluyen 275 taxones de cactáceas (Ballesteros-Barrera, 2017).

La IUCN es una unión de miembros compuesta por organizaciones gubernamentales y organizaciones de la sociedad civil. Este grupo de organizaciones genera un listado "Lista Roja de Especies Amenazadas", utilizando las categorías y criterios de esta lista, los cactus son el quinto grupo taxonómico evaluado más amenazado, con un 31% de sus especies amenazadas, dentro de este grupo hay proporciones distintas de acuerdo con la categoría de riesgo en que se incluyen: 6.7% se encuentran en peligro crítico, 12% en peligro y 9.4% como vulnerables (Goettsch, 2015).

El comercio internacional de muchas cactáceas está regulado por la CITES, es un acuerdo en el que se agrupan las especies de plantas y animales que se encuentran en peligro, para regular o detener su comercio internacional para contribuir a su conservación. Esta convención incluye toda la diversidad de la familia Cactaceae en alguno de sus apéndices, siendo que la gran mayoría se incluyen en el Apéndice II,

(CITES, 2021) en donde las especies que se incluyen no necesariamente están en peligro de extinción, pero su comercio debe controlarse a fin de evitar una utilización incompatible con su supervivencia (CITES, s/f). De acuerdo con la NOM-059-2010, *O. macdougallii* está categorizada como amenazada.

### **Clasificación taxonómica de *Ortegocactus macdougallii* Alexander**

Especie endémica del estado de Oaxaca, con localidad tipo San José Lachiguiri en terreno rocoso (Bravo-Hollis, 1991). Descubierta por primera vez por el señor Francisco Ortega durante el invierno de 1951-1952 ayudante del naturalista Thomas Bailie Macdougall, es por lo que fue nombrada de esa manera por E. J. Alexander (curador del Jardín Botánico de Nueva York), en honor a sus descubridores (Tóth Norbert, 2013; Bravo-Hollis, 1991).

Reino: Plantae

Phyllum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Subfamilia: Cactoideae

Tribu: Cacteeae

Género: *Ortegocactus*

*Especie:* *Ortegocactus macdougallii*

*Nombres comunes* (Biznaga Pistache de Chico Ortega)

### **Descripción botánica de *Ortegocactus macdougallii***

Plantas muy cespitosas. Tallos globosos, glosoplano o hasta subcilíndricos, de 3 a 4 cm de diámetro, de color verde grisáceo claro. Tubérculos grandes, romboideo-aplanados, no surcados o con surco pequeño y ocasionalmente largo, irregularmente espiralados, apretados. Areolas dimorfas; las espiníferas orbiculares, cuando jóvenes, lanosas; las floríferas axilares. Espinas radiales 7 u 8, de 5 a 10 mm de longitud. Espina central de 4 a 5 mm de longitud, acicular, con la base blanca y la punta negra. Flores dispuestas en el ápice del tallo, en la areola axilar lanosa de los tubérculos jóvenes, diurnas, infundibuliformes, de 20 a 30 mm de longitud, amarillas, pericarpelo muy hundido entre los tubérculos, desnudo; tubo receptacular algo corto, desnudo, de color blanco verdoso; segmentos del perianto espatulados a lanceolados, amarillos, nectario corto y pequeño; estambres cortos que no sobresalen de la corola; estilo con 4 lóbulos estigmas. Fruto, al madurar, incluido entre los tubérculos, globoso, hasta elipsoidal, de unos 5 mm de longitud, desnudo, hacia la base delgado y blanquecino, hacia arriba anaranjado rojizo, conserva adheridos los restos secos del perianto. Semillas piriformes, de 1 mm de longitud, con estrofiolo grueso, testa foveolada, de color castaño negruzco (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

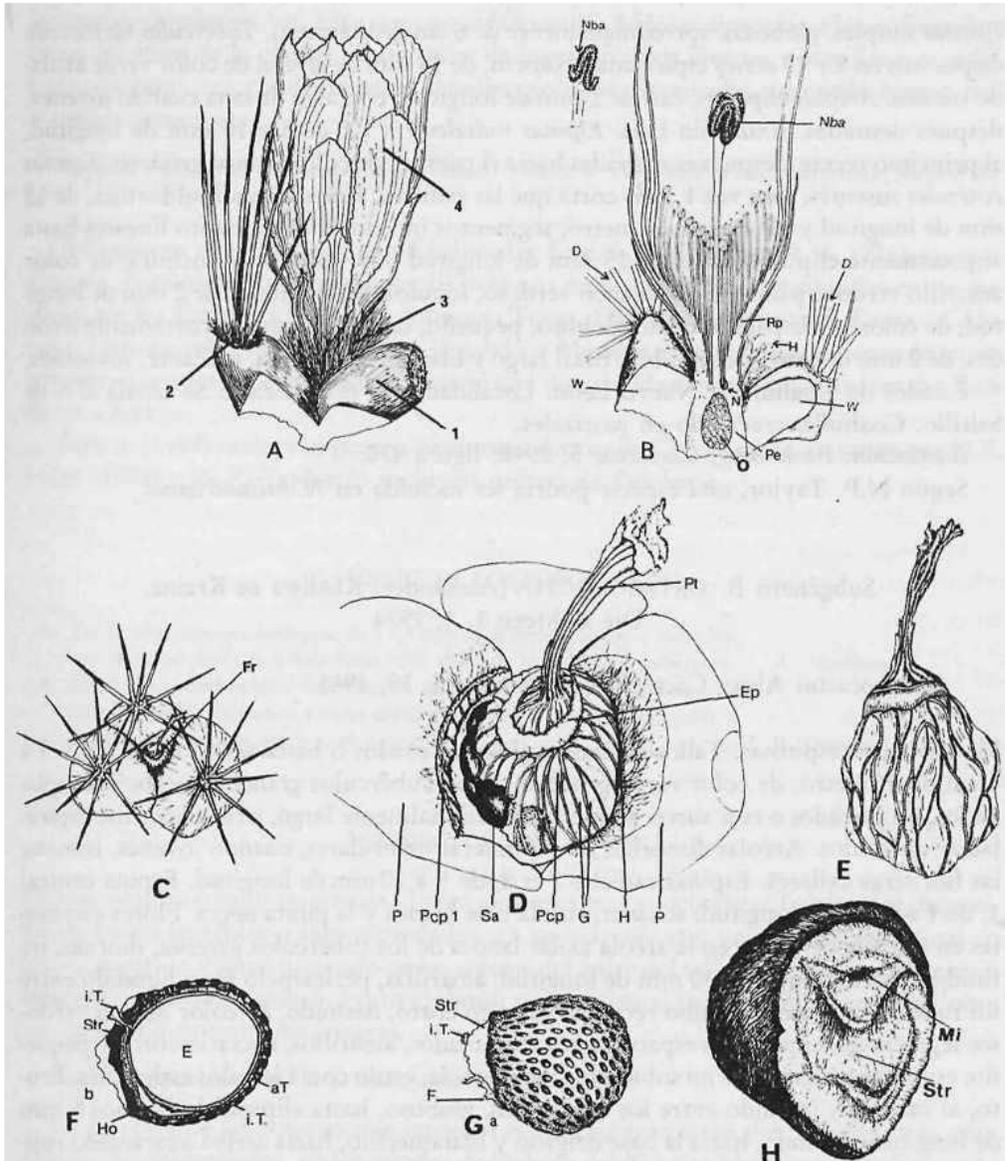


Figura 3. Dibujos esquemáticos de la flor, el fruto y la semilla de *Ortegocactus macdougallii*.

A, aspecto exterior de la flor mostrando: 1, tubérculo; 2, areola espinífera; 3, pelos axilares de la areola florífera; 4, segmentos del perianto; B, corte longitudinal de la misma, mostrando: Pe, pericarpelo incluido entre los tubérculos; W, tubérculos, H, pelos axilares; D, espinas; Rp, receptáculo desnudo; N, nectario pequeño; Na, estigma, y Nba, lóbulos del estigma; C, fruto incluido entre los tubérculos, D, detalle de este, y E, aspecto exterior, en donde se aprecian: Fr, fruto profundamente imbuido entre los tubérculos; P, base del tubérculo; Pcp, pericarpelo, Sa, semillas; G, podarios del fruto; H, pelos axilares; Ep, base del tubo receptacular, y Pt, perianto seco persistente. F, corte de la semilla, G, aspecto exterior, y H, vista polar de la misma, mostrando: a, tegumento externo; i.T., tegumento interior; Str, estrofiolo; Ho, cavidad; E, embrión; F, región del hilo; a, testa foveolada, y Mi, micrópilo (Tomados de Krainz., 1974 en Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

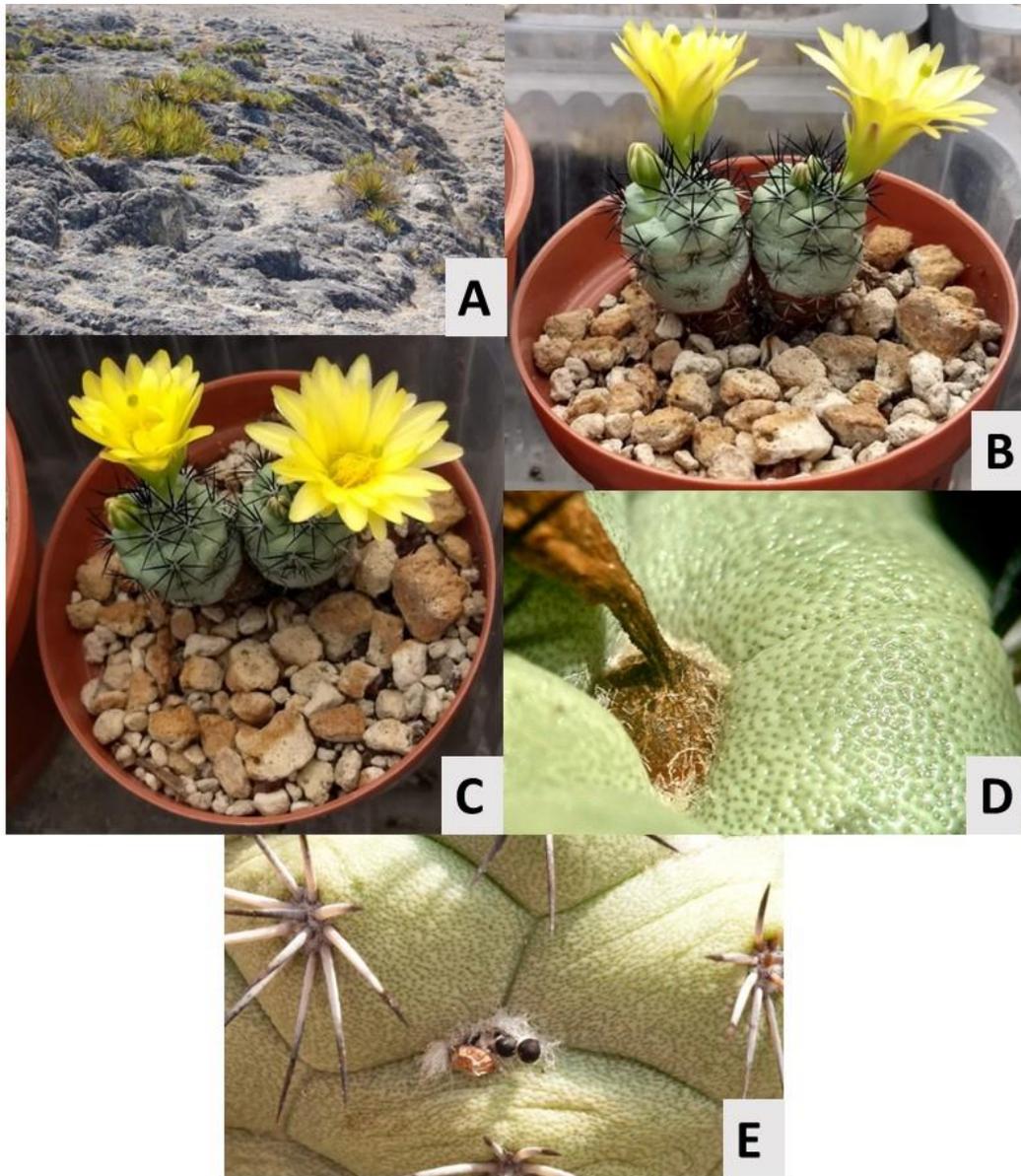


Figura 4. A) Hábitat natural de *Ortogocactus macdougallii* Oaxaca (foto de Tóth Norbert, en Tóth Norbert 2013), B) y C) Plantas adultas en condiciones de invernadero en el Jardín Botánico del IB (Fotos Emmanuel Vázquez), D) Detalle de un fruto maduro y la epidermis punteada (foto Dr.Jürgen Menzel, en Tóth Norbert 2013) E) Dehiscencia del fruto liberando las semillas (foto Stefan Nitzschke, en Tóth Norbert 2013)

## **Estado actual de *Ortegocactus macdougallii***

*O. macdougallii* es una cactácea endémica del estado de Oaxaca, se conoce una población de la especie en el municipio de San José Lachiguiri (Guzmán *et al.*, 2003; Alexander, 1961; Weightman, 2004). *Ortegocactus* es un género monotípico, comparte muchas características morfológicas con miembros del clado Mammilloid (especies del género *Mammillaria*) (Butterworth *et al.*, 2002). *O. macdougallii* fue descrita por Alexander en 1961, en 1978 la Dra. Helia Bravo y Hernando Sánchez la reclasificaron como *Neobesseya macdougallii*, clasificación aceptada hasta que en 1985 Zimmermann con análisis filogenéticos concluyó que *Ortegocactus* era miembro de un clado filogenéticamente distinto que contenía *Coryphanta*, *Escobaria* y *Mammillaria* (Butterworth *et al.*, 2002). Butterworth y colaboradores en 2002 realizaron el análisis sistemático molecular de la tribu Cacteeae y concluyeron que *Ortegocactus* está más cercano a *Mammillaria* que a otros miembros del clado “Mammilloid” y que no presenta ninguna relación directa con *Coryphanta* o *Escobaria*.

Desafortunadamente la población de *O. macdougallii* se han visto disminuidas con tendencia a desaparecer, debido a distintas causas, como la degradación del suelo por las actividades humanas, la colecta de frutos, semillas, plántulas y plantas adultas, siendo altamente valoradas por coleccionistas, por sus rasgos morfológicos únicos (flores amarillas, tamaño pequeño y el color verde oliva de su epidermis), otro de los problemas que enfrenta esta cactácea es relacionada a la biología de las plantas, con una tasa de crecimiento lenta, baja germinación y la auto-incompatibilidad, resultando con una baja producción de frutos y semillas, aunado a la baja supervivencia en su hábitat natural (SEMARNAT, 2010; Pillbeam y Weightman, 2006; Arellano y Estrada-Luna, 2012).

Es por eso que distintas organizaciones se han preocupado por ingresar a *O. macdougallii* en sus listados para protegerla, la CITES, la incluye en su Apéndice II, para regular su comercio y que su existencia no se vea amenazada, la UICN aún no la incluye en su lista roja, porque no se tiene la información suficiente del estado de su población, la NOM-059-SEMARNAT-2010 la tiene dentro de la categoría “A”

(amenazada) que se refiere a “aquellas especies, o poblaciones de las mismas, que podrían llegar a encontrarse en peligro de desaparecer a corto o mediano plazos, si siguen operando los factores que inciden negativamente en su viabilidad, al ocasionar el deterioro o modificación de su hábitat o disminuir directamente el tamaño de sus poblaciones” (SEMARNAT, 2010).

Los coleccionistas han puesto en riesgo a esta especie debido a que es altamente valorada, a pesar de eso, los reportes que se tienen de su propagación son muy pocos. Perusquia y Estrada-Luna en 2012 reportaron precios desde los 5 hasta los 20 euros por una planta de 2-3 cm, en páginas de internet se cotizan paquetes de 7 semillas de con un costo de hasta 35 dólares (Fig. 5). Verdi un vivero con autorización de la SEMARNAT, cotiza plantas en su raíz con un costo de \$290MXN o una planta injertada en \$240 MXN, en 2018 la Tienda Tigridia del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM puso en adopción un lote de 200 plantas con una cuota de recuperación de \$120 MXN. La oferta de plantas publicadas para su venta en Internet es amplia, *Ortegocactus* es uno de los géneros que más se ofertan (Villavicencio *et al.*, 2010). Siendo escasos los lugares que cuentan con el permiso para su comercialización, lo que sigue poniendo en riesgo las poblaciones naturales, es por eso que se debe promover el estudio, investigación, y conservación de la especie *in situ* y *ex situ*. En esa segunda opción el Cultivo de Tejidos Vegetales es una herramienta que podría permitir cumplir con muchos objetivos.



Figura 5. Costo de semillas de *O. macdougalii* (Captura de pantalla tomada de <https://africa-seeds.com/products/ortegocactus-macdougallii-7-pcs-seeds>).

## **Cultivo de Tejidos Vegetales**

El Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV) se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street, 1977). Es la ciencia del cultivo de células, tejidos u órganos vegetales aislados de la planta madre (explante), en medios artificiales (George *et al.*, 2008). Se basa en el principio de la totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para generar una planta completa (Feri y Paul, 2000).

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales tiene un amplio rango de propósitos, van desde la investigación de procesos de desarrollo de plantas, estudios de genes funcionales, micropropagación de plantas comerciales, generación de plantas transgénicas con características industriales y agronómicas específicas, mejoramiento de cultivos y mejoramiento de plantas, eliminación de virus en materiales infectados para producir material vegetal saludable de alta calidad, preservación, conservación de germoplasma, propagación y rescate de especies vegetales amenazadas o en peligro de extinción. Se hacen cultivos de órganos o células para la producción de metabolitos secundarios de interés industrial y farmacéutico (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2008).

Para hacer cultivo de tejidos se han reconocido cinco fases o etapas a llevar a cabo (González *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008). George en 2008 las menciona como fases de la micropropagación y hace mención de que son una guía general, pero no siempre se aplican rigurosamente.

### **Etapas**

Etapa 0  
Selección de la (s) planta (s) madre (s) (González *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

Antes de iniciar los cultivos se deben seleccionar las plantas madre, según los requerimientos de la investigación, es recomendable mantener esta selección libre de síntomas o enfermedades. Es ventajoso mantener un riego y nutrición adecuados para

que el cultivo *in vitro* sea exitoso. El crecimiento, morfogénesis y tasas de propagación *in vitro* pueden mejorarse mediante un pretratamiento fitosanitario de las plantas madre para reducir la presencia de microorganismos externos e internos.

#### Etapa I

Establecimiento aséptico de los cultivos (González *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

La siguiente etapa una vez seleccionada la planta madre es establecer el explante o fracción de tejido en condiciones de cultivo, este establecimiento se hace en condiciones libres de contaminantes microbianos. La elección del explante depende de la especie y la vía de regeneración que se siga en la Etapa II. Es una práctica común iniciar con el empleo de medios nutritivos libres de reguladores de crecimiento.

#### Etapa II

Proliferación o multiplicación del tejido (González *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

En esta etapa se hace la propagación a partir de los explantes que se hayan establecido en la Etapa I; en esta etapa existen tres vías para la proliferación *in vitro*:

- a) Organogénesis: obtención de órganos, como tallos, raíces u hojas.
- b) Embriogénesis somática: se pueden obtener embriones que no son resultado de la fusión de gametos
- c) Multiplicación a partir de yemas preformadas

En las dos primeras vías se puede seguir una generación directa, mediante el uso de tejidos (explantes) con una baja diferenciación celular (meristemas, areola); o bien una generación indirecta, esta ocurre cuando el explante genera una masa de células indiferenciadas denominada callo, que con el tratamiento adecuado se pueden obtener brotes o embriones somáticos.

Para favorecer la proliferación del tejido en esta etapa se emplean medios nutritivos adicionados con reguladores de crecimiento vegetal (RCV), principalmente auxinas y citocininas (González *et al.*, 2012).

### Etapa III

Elongación y enraizamiento (González *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

Esta etapa consiste en conseguir que los brotes obtenidos en la fase anterior crezcan en tamaño y formen su raíz, constituyéndose así una planta completa, para que se favorezca su posterior establecimiento en condiciones *ex vitro*. Dependiendo de la vía de regeneración y el tipo de planta se puede omitir este paso, debido a que en algunas especies el enraizamiento ocurre de manera simultánea en la fase de la proliferación, mientras que en la vía de la embriogénesis somática en esta fase ocurre la maduración y germinación de los embriones somáticos, en donde adquieren la bipolaridad meristemática (apical y radicular), mientras que en la organogénesis los brotes obtenidos son unipolares (apical) y es por eso que se debe inducir la formación de la raíz.

### Etapa IV

Aclimatización (González *et al.*, 2012; George *et al.*, 2008).

Los métodos mediante los cuales las plántulas se transfieren del ambiente *in vitro* al ambiente *ex vitro* son extremadamente importantes, si no se llevan a cabo de manera adecuada puede resultar en una pérdida significativa de material propagado. Los efectos generados por las condiciones de incubación de los cultivos, así como la atmósfera *in vitro* y los medios de cultivo pueden provocar anomalías anatómico-fisiológicas en las plantas regeneradas (ceras cuticulares poco desarrolladas, mal funcionamiento de las estomas y del mecanismo fotosintético). Cuando se les suministra sacarosa (o alguna otra fuente de carbono) y una baja intensidad lumínica, las plantas no dependen completamente de su propia fotosíntesis, adquieren una condición mixotrófica. Por lo que es necesario adaptarlas de forma gradual al medio

externo disminuyendo progresivamente la humedad relativa e incrementando progresivamente la intensidad de luz. Las nuevas plantas deben mantenerse en un ambiente con alta humedad, normalmente se colocan en recipientes con una cubierta plástica o con nebulizaciones constantes. La elección de un sustrato con buenas características físicas (que no se compacte, con buen drenaje es primordial, además de características del suelo donde se desarrollan normalmente las plantas), es clave para el éxito de esta etapa.

Una vez superada la fase experimental del cultivo de tejidos vegetales, este tipo de propagación presenta diversas ventajas y desventajas con respecto a la propagación convencional (González *et al.*, 2012; George, 2008):

- No se requiere de mucho material vegetal para iniciar el cultivo.
- Se requiere de poco espacio para la obtención de grandes cantidades de tejido.
- La propagación idealmente se lleva a cabo en condiciones asépticas, por lo tanto, se puede lograr que las plantas propagadas estén libres de patógenos (virus, bacterias u hongos).
- Al tener condiciones de cultivo controladas, la producción de plantas se puede realizar durante todo el año.
- El cultivo de tejidos vegetales ha demostrado ser un procedimiento confiable para la conservación *ex situ*, (conservación de germoplasma).
- Una solución para una elevada demanda de plantas.
- El material vegetal propagado puede ser almacenado durante largos periodos.

Algunas de las desventajas o limitaciones que se pueden presentar al emplear esta técnica derivan principalmente de las habilidades para su operación.

- Se necesita de instalaciones e infraestructura especializada, que llega a tener un costo elevado.
- Una de las más grandes limitaciones de los cultivos es el permanente riesgo de contaminación.

- La falta de respuesta morfogénica de los explantes en cultivo es una gran barrera para esta técnica, pero esto se puede resolver con experimentación: la elección de tipo de explante, medio de cultivo, así como la combinación, concentración o el tipo de regulador de crecimiento vegetal.

## **Medios de cultivo**

La selección del medio de cultivo debe realizarse con cuidado y de manera informada, en caso de que ya haya algún reporte de la especie, si no hay de la misma especie la selección del medio se puede realizar con el reporte de algún miembro del mismo género o de la misma familia, pero si no se cuenta con literatura, el desarrollo de un medio de cultivo adecuado se basa en ensayo y error. En general, los medios contienen sales inorgánicas, y componentes orgánicos como reguladores de crecimiento vegetal (RCV), vitaminas, una fuente de carbono, inositol y un agente gelificante (Smith, 2013).

La formulación de Murashige y Skoog (MS) (1962) es la más utilizada, esta se desarrolló para asegurar que ningún aumento en el crecimiento celular *in vitro* se debiera a la introducción de sales adicionales de extractos de tejido vegetal que estaban probando en ese momento, esta fórmula aseguró que los nutrientes inorgánicos no limitaran el crecimiento de las células de plantas de tabaco, y los suplementos orgánicos como el extracto de levadura, el agua de coco, el hidrolizado de caseína y los extractos de plantas ya no eran fuentes esenciales de sales inorgánicas (Smith, 2013).

Dependiente del propósito u objetivo del cultivo, será el tipo y la concentración del regulador de crecimiento vegetal.

## **Auxinas**

Fueron de las primeras hormonas descubiertas en plantas, forman parte de una extensa lista de señalizadores químicos que regulan el desarrollo vegetal. El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más abundante en los tejidos vegetales. Una de las

principales funciones de las auxinas en plantas superiores es la regulación del crecimiento longitudinal de tallos jóvenes y coleóptilos (Taiz y Zeiger, 2006).

La regulación del crecimiento vegetal puede depender en parte de la cantidad de auxina libre presente en las células, en los tejidos y en los órganos. El AIA se sintetiza principalmente en la yema apical y es transportado polarmente a la raíz. Las auxinas juegan un papel fundamental en la dominancia apical, el surgimiento de raíces laterales, la abscisión de las hojas, la diferenciación vascular, la formación de yemas florales y el desarrollo del fruto (Taiz y Zeiger, 2006).

En el cultivo de tejidos vegetales, dependiendo de la presencia de RCV en el medio, los cambios en la concentración de auxinas pueden cambiar el tipo de crecimiento, por ejemplo, la estimulación en la formación de la raíz puede cambiar a la inducción de callo. Las auxinas son generalmente requeridas para la inducción de callo, debido a que éstas son capaces de alterar la fisiología de tejidos genéticamente programados que habían adquirido un estado diferenciado, las células responden a esta hormona, regresando a un estado desdiferenciado y que comienzan a dividirse desde ese estado (George, 2008).

Las auxinas son necesarias para promover el crecimiento inicial de meristemas y brotes del explante. Una baja concentración de éstas con una alta concentración de citocininas, es usualmente benéfico para la fase dos del cultivo, aunque en algunos casos solo la presencia de citocininas es suficiente (George, 2008).

### **Citocininas**

Las citocininas afectan a muchos procesos fisiológicos y del desarrollo, entre los que se incluyen: la senescencia de la hoja, la movilización de los nutrientes, la dominancia apical, la formación y actividad de los meristemas del ápice caulinar, el desarrollo floral, la ruptura de la dormición de la yema y la germinación de la semilla. Las citocininas también parecen mediar en muchos aspectos de desarrollo regulados por la luz, como la diferenciación de los cloroplastos, el desarrollo del metabolismo autotrófico y la expansión de cotiledónes y la hoja. Se ha dicho que la dominancia apical está

determinada principalmente por las auxinas, los estudios fisiológicos indican que las citocininas participan en el inicio del crecimiento de las yemas laterales, el aplicar citocininas a yemas axilares de muchas especies estimula su actividad de división celular y su crecimiento (Taiz y Zeiger, 2006).

Las citocininas en el cultivo de tejidos vegetales son necesarias para la división celular, estas hormonas son muy efectivas en la promoción de la iniciación directa o indirecta de brotes, la presencia de citocininas de manera endógena puede ser la causa de la inhibición en la formación de embriones somáticos, en algunos genotipos (George, 2008).

La relación entre auxina/citocinina regula la morfogénesis en cultivo de tejidos, las relaciones altas de auxina/citocinina estimulan la formación de raíces, valores bajos de la relación auxina/citocinina dan lugar a la formación de tallos, a niveles intermedios el tejido crece como un callo indiferenciado (Skoog y Miller, 1965).

## **Manitol**

El manitol es un osmorregulador, estos son metabolitos hidrofílicos, entre los que se destacan azúcares, aminoácidos, glicerol, manitol, y otros metabolitos de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo normal de las células. Éstos se acumulan en el citoplasma y en la vacuola en altas concentraciones bajo condiciones de estrés osmótico y tienen un papel primario en el mantenimiento de la disminución del potencial osmótico en el citosol (Chen y Murata, 2002).

El uso del manitol en CTV tiene distintos fines, Reyes-Hernández en 2021 reportó su uso para disminuir la hiperhidricidad de brotes en *Mammillaria luethyi*, Espinosa-Reyes y colaboradores en 2021 estudiaron el efecto del manitol en la conservación *in vitro* de *Morus alba* en donde el uso de este osmorregulador disminuyó el crecimiento de los brotes y el número de hojas activas con respecto al tratamiento control. Debido a que el efecto que provoca el manitol es una disminución del potencial osmótico e hídrico del medio de cultivo, lo cual dificulta la absorción de agua y nutrientes ocasionando una

reducción en el crecimiento de la planta, pero ayudando a revertir fenómenos como la hiperhidratación de las plantas cultivadas *in vitro*.

### Meristemos y dominancia apical

Los meristemos son grupos de pequeñas células con características embrionarias, éstos se autoperpetúan, pueden retener su carácter embrionario indefinidamente, algunos durante muchos años, como en los árboles, esta capacidad es debida a que algunas células meristemáticas no quedan determinadas a diferenciarse, y retienen su capacidad para la división celular (células madre), las otras células (células hijas) entran en un período de divisiones celulares rápidas antes de que cesen las divisiones y puedan reconocerse como tipos de células específicas (Fig 6) (Taíz y Zeiger, 2006).

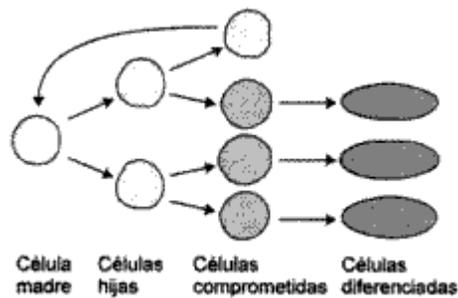


Figura 6. Las células madre generan células hijas, algunas de las cuales permanecen no determinadas y mantienen las propiedades de las células madre, mientras las demás se determinan y llegan a diferenciarse (Tomado de Taíz y Zeiger, 2006).

Existen dos tipos de meristemos principales los primarios y secundarios, los primeros se forman durante la embriogénesis, el meristemo apical y el meristemo radicular, generan los tejidos y órganos primarios que constituyen el cuerpo primario de la planta, mientras que los secundarios se desarrollan de manera postembrionaria, se incluyen a los meristemos axilares, los de inflorescencias y los laterales. Los meristemos axilares se forman en las axilas de las hojas y derivan del meristemo apical, el crecimiento y desarrollo de éstos produce ramificaciones del eje principal de la planta, que en algunas plantas como en el maíz estas ramificaciones se ven disminuidas o nulas por la dominancia apical (Taíz y Zeiger, 2006).

La inhibición del crecimiento de yemas axilares ocurre debido a un fenómeno conocido como dominancia apical en donde el movimiento basipétalo de las auxinas sintetizadas en el ápice, junto con el movimiento acropétalo de las estrigolactonas sintetizadas en las raíces, la remoción del ápice reduce la concentración de auxinas a lo largo del tallo, lo que provoca un aumento en la concentración de citocininas producidas en la raíz aumenta, lo que provoca la activación de yemas axilares y el surgimiento de brotes laterales (Taiz y Zeiger, 2006; Durbak, *et al.*, 2012). Un ejemplo de una planta con una fuerte dominancia apical es el maíz, el cual tiene un solo eje de crecimiento con pocos o nulos brotes laterales (Taiz y Zeiger, 2006).

El que las auxinas regulen la diferenciación y organogénesis vegetal implica que en los sitios de crecimiento e iniciación de órganos llegan a presentar una alta concentración de estas hormonas (Durbak, *et al.*, 2012). En su estudio de 1996 Cline probó el efecto de auxinas endógenas en el surgimiento de brotes laterales con 10 especies de plantas y a las que en estado intacto tenían poca o nula brotación lateral las definió como “plantas con fuerte dominancia apical”.

Ramírez-Serrano y Teixeira en 2008 ejemplifican tres tipos de crecimiento y propagación en cactus determinados por la dominancia apical, uno con crecimiento monopodial en donde la producción de auxinas en el ápice mantiene en dormancia las yemas laterales y para que éstas se activen se tendría que eliminar el ápice o dañarlo; otro con crecimiento prolífero o cespitoso en donde no existe la dominancia apical, ya las areolas de la base se encuentran activas por las citocininas; por último los cactus que presentan un tallo ramificado, éstos no tienen dominancia apical, las citocininas activan las areolas.

### **Cultivo *in vitro* de cactáceas**

Los métodos para el cultivo *in vitro* de cactáceas iniciaron su desarrollo hace más de 50 años, la técnica más común para la micropropagación de cactáceas es mediante la activación de las yemas axilares, la formación de brotes adventicios y la embriogénesis somática. Estos métodos son aplicados en múltiples géneros de la familia Cactaceae

como *Astrophytum*, *Aztekium*, *Cephalocereus*, *Cereus*, *Copiapoa*, *Coryphanta*, *Echinocactus*, *Echinocereus*, *Ferocactus*, *Gymnocalcyum*, *Leuchtenbergia*, *Mammillaria*, *Stenocactus*. El uso de diversas técnicas de cultivo *in vitro* dentro de los cactus tiene distintos objetivos, desde la micropropagación de plantas ornamentales debido a la creciente demanda de plantas, que después de haber desarrollado una metodología específica para la micropropagación de una especie, la producción de plantas suele ser más rápida que el cultivo tradicional; la producción de metabolitos secundarios es una ventaja que presenta el CTV, en donde se puede obtener metabolitos útiles con valor farmacéutico, cosmético y nutracéutico uno estos ejemplos es la producción de paclitaxel, compuesto utilizado como un antitumoral, obtenido del género *Taxus* (Ketchum *et al.*, 1991) otro ejemplo es la producción de podofilotoxinas obtenidas de *Podophyllum peltatum* (Kutney *et al.*, 1991) y utilizadas como tratamiento a verrugas genitales (Pérez-Alonso y Jiménez 2011); y en la ingeniería genética de cactus, para obtener nuevos cultivares que por técnicas tradicionales presentan problemas en su producción (Lema-Rumińska y Kulus, 2014).

Cuadro 1. Algunos reportes de cultivo de tejidos en la familia Cactaceae.

Especie	Medio de cultivo y condiciones de cultivo	Resultados	Referencia
<i>Cereus peruvianus</i>	MS; Tirosina 125mg/L	Mayor concentración de alcaloides en las células indiferenciadas (callo) que, en la planta madura, la presencia de tirosina aumenta la producción de alcaloides en callo.	Braz de Oliveira y De Fatima Pires Da Silva Machado, 2003
<i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.	MS; Picloram (0, 1, 2, 4, 8 y 16 mg/L)	El mayor número de embriones somáticos fueron generados con 4mg/L, pero el análisis estadístico no indicó una relación entre la concentración del RCV y el número de	Gomes <i>et al.</i> , 2006

		embriones.	
<i>Hylocereus costaricensis</i>	MS; BAP (0-117mg/L)	Un promedio de 5 brotes por areola, y aclimatización de plantas.	Viñas <i>et al.</i> , 2012
14 especies de <i>Turbincarpus sp.</i>	MS; (BAP/ 2iP)	4.0 brotes por explante en <i>T. hoferi</i> , 26.3 brotes por explante en <i>T. pseudomacrochele</i> subsp. <i>lausseri</i>	de la Rosa-Carrillo <i>et al.</i> , 2012
<i>Copiapoa tenuissima</i> Ritt. forma <i>monstruosa</i>	MS; ABA (0, 0.22, 2.27, 22.7, 227.2 mg/L) ) y sacarosa (1, 3, 5%)	Formación de callo a concentraciones bajas de RCV, a altas concentraciones afecta desarrollo de embriones.	Lema-Rumińska, Goncerzewiczs, y Gabriel M., 2013
<i>Mammillaria hernandezii</i>	MS líquido; ANA/BA (0/1, 0/2, 0.5/1, 0.5/2, 0.1/3, 0/3 y 0.5/3 mg/L)	64 brotes	Pérez, 2015
<i>M. geminispina</i> , <i>M. magnimamma</i> , <i>M. marcosii</i> , <i>M. mercadensis</i> , <i>Coryphantha radians</i> y <i>Ferocactus latispinus</i>	MS (AIA y kinetina)  Desde 0 hasta 10 mg/L	Cualquier especie requiere de la presencia de algún RCV para la formación de brotes.	Ramírez y Salazar, 2016
<i>Astrophytum asterias</i> (Zucc)	MS; BAP/ANA (2/0.5 mg/L); KIN/ANA (2/0.5 mg/L)	Formación de callo, formación de 175 brotes	Gaona A., 2018
<i>Aztekium valdezii</i>	MS; BAP/ANA (1/0.2 y 0.5/0.023 mg/L)	Formación de callo, 127 brotes	Vega A., 2019

### **Cultivo de Tejidos Vegetales en *Ortegocactus macdougallii***

El cultivo *in vitro* de *O. macdougallii* es poco reportado, existe un reporte de su cultivo realizado por Arellano y colaboradores en 2013, donde evaluaron el efecto de reguladores de crecimiento en la organogénesis y multiplicación de la especie, partieron desde brotes jóvenes de plantas en condiciones de invernadero, realizaron una desinfección previa al cultivo, su establecimiento del cultivo se realizó en medio MS suplementado con ANA (0.0, 0.24, 0.81, 2.4 mg/L) y BAP (0.0, 0.29, 0.98 y 2.9 mg/L) , en esta fase obtuvieron los mejores resultados con la combinación de ANA/BAP (0.81/2.9 mg/L), para la fase de propagación utilizaron medio MS con la combinación anterior y adicionaron dos concentraciones más de BAP (4.3 y 5.7 mg/L), después de 110 días de cultivo contabilizaron número, longitud y peso fresco de los brotes, porcentaje de explantes enraizados y longitud de las raíces. Para la fase de enraizamiento utilizaron dos concentraciones de ácido indol-3-butirico (IBA) (0.32 y 0.98 mg/L) en medio MS al 50 %, y lo compararon con medio MS sin reguladores al 50% y 25%. Obtuvieron que la combinación de ANA y BAP a las concentraciones usadas produjeron un promedio entre 5 o 6 brotes por explante, pero, los obtenidos con las concentraciones más bajas fueron estadísticamente más grandes, la adición de IBA para el enraizamiento resultó en un porcentaje mayor de brotes enraizados y un mayor número de raíces. El que solo exista un reporte de cultivo de esta especie que se encuentra en peligro de extinción nos permite explorar algunas otras posibilidades para su conservación y propagación.

## Justificación

*O. macdougallii* es una cactácea altamente valorada por los coleccionistas nacionales e internacionales, se conoce solo una población de la especie en el estado de Oaxaca, las actividades humanas la han colocado dentro de distintos listados que recomiendan su protección.

La reproducción convencional de la especie no permite abastecer las altas demandas de ejemplares adultos, por lo tanto, la extracción y tráfico ilegal de organismos completos se ha visto agudizada, aunado a todo esto su biología limita la reproducción mediante la germinación, es por eso que explorar y probar la efectividad de nuevas técnicas para la multiplicación de ésta y otras especies es fundamental, para su conservación.

El Cultivo de Tejidos Vegetales abre una oportunidad para la generación de nuevos conocimientos que pueden permitir que las poblaciones naturales se vean menos afectadas, la micropropagación mediante la activación de meristemos axilares (areolas), resulta en la obtención de brotes consolidados, para la regeneración de plantas completas. La probada solidez y efectividad de estos conocimientos y procedimientos permitirían a corto o mediano plazo la generación de un plan de manejo y así desarrollar un plan de manejo sustentable de ésta y muchas otras especies vegetales.

# Objetivos

## Objetivo general

- Establecer condiciones para la regeneración *in vitro* de plantas completas de *O. macdougallii*.

## Objetivos particulares

- Establecer condiciones de cultivo *in vitro* de secciones de tallos que permitan romper la dominancia apical y activar el crecimiento de brotes en yemas axilares.
- Promover el enraizamiento de los brotes generados.
- Lograr la aclimatización y establecimiento en condiciones de invernadero de plantas regeneradas *in vitro*.

## Materiales y métodos

### *Material biológico*

A partir de cultivos de *O. macdougallii* de plántulas germinadas *in vitro* ( $\leq 1-6$  cm altura) en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CTV), Jardín Botánico, IBUNAM, fueron seleccionadas 15 plántulas (1.5-2.0cm de altura) de aspecto semejante (Fig. 7).



Figura 7. Plántulas germinadas en condiciones *in vitro* en el laboratorio de CTV Jardín Botánico, IBUNAM.

### *Inducción morfogénica. Cultivo de explantes de Tallo.*

Bajo condiciones asépticas los ápices y las raíces de 15 plántulas fueron disectadas, las raíces fueron descartadas, mientras que los ápices fueron colocados en medio MS sin RCV. Al resto del Tallo (T) se le hizo un corte longitudinal obteniéndose 2 secciones de cada tallo, cada una con 8-12 areolas. Los explantes fueron sembrados en medio de cultivo Murashige-Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962), adicionado con distintas concentraciones de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) dando un total de cinco tratamientos donde se incluye el grupo control y otros adicionados con BAP/ANA mg/L (0/0; 1.0/0.4; 1.5/0.4; 2.0/0.4 y 3.0/0.8), sacarosa 30g/L, manitol 1 g/L, pH. 5.7 gelificados con 8g/L de agar bacteriológico. Se sembraron dos explantes de tallo por frasco, tres repeticiones por tratamiento (Fig. 8).

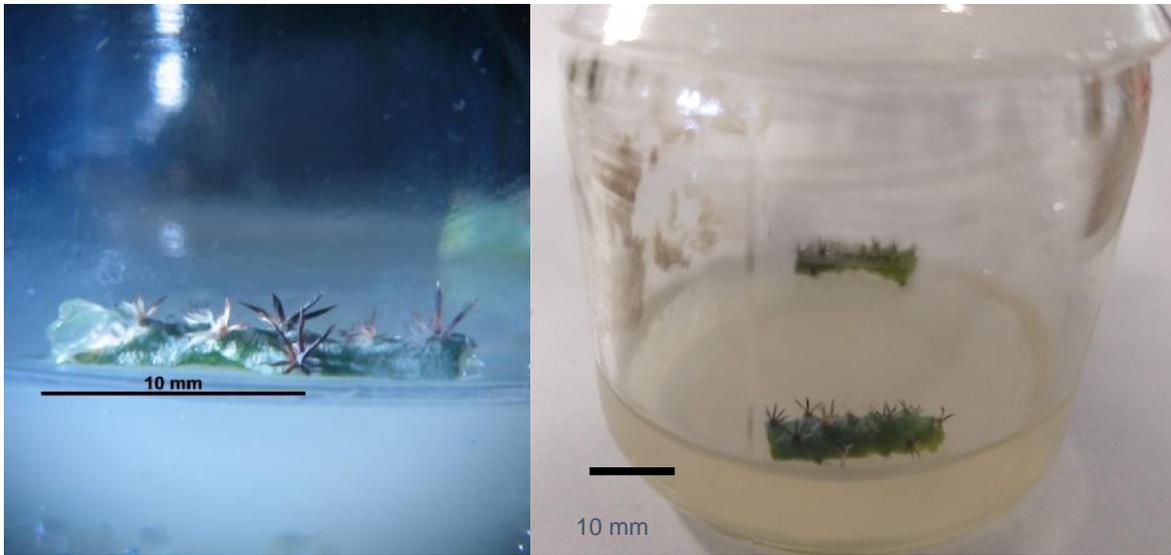


Figura 8. Explantes de *O. macdougallii*. A) Se observa detalle de cada explante de Tallo cada uno con 8-12 areolas; B) Se observa que se sembraron dos explantes por frasco.

El tiempo de inducción de los cultivos (en presencia de los RCV) fue de 9 semanas, al término de éstas se realizó un primer subcultivo de todos los explantes a medio basal (MS sin RCV), en esta etapa algunos explantes generaron algunos brotes, éstos fueron individualizados y se colocaron en el mismo medio que los explantes para la etapa de la proliferación; 18 semanas después de haber hecho el primer subcultivo se realizó una individualización de todos los brotes que se generaron, se colocaron en medio MS con 30g/L de sacarosa, 2g/L de manitol y 8g/L de agar bacteriológico, se colocaron dos brotes por frasco, pasadas 25 semanas de haber individualizado los brotes se realizó un subcultivo a un medio MS reducido en sales inorgánicas y orgánicas y/o en sacarosa (Apéndice 1).

Todos los procesos anteriores se realizaron en condiciones asépticas y todos los medios de cultivo, instrumental y materiales utilizados fueron esterilizados en autoclave 1.5Kg/cm<sup>2</sup>, 121°C. Los cultivos fueron colocados en una cámara de incubación a 25 ± 2°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

## ***Análisis de datos***

Para el número de brotes obtenidos al final de la etapa de proliferación a la semana 27 se realizó una prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ), se realizó mediante el programa SAS® v9.0 para Windows.

## ***Aclimatización***

Para la fase de la aclimatización, fueron seleccionadas plántulas con una altura entre 1-2 cm, de entre todos los tratamientos anteriores, se realizaron cuatro pruebas: (1) reducción de sales, (2) reducción de la fuente de carbono, (3) la combinación de ambos y (4) un control, en el cual se hizo un subcultivo en el que las condiciones del medio no se cambiaron (Apéndice 1);

1.- Medio MS reducción de micro y macronutrientes a un **25%** con 2g/L de manitol, 30 g/L de sacarosa y 8 g/L de agar bacteriológico, pH 5.8.

2.- Medio MS 100% con 2g/L de manitol, **10 g/L de sacarosa** y 8 g/L de agar bacteriológico pH 5.8.

3.- Medio MS **25%** con 2g/L de manitol, **10 g/L de sacarosa** y 8 g/L de agar bacteriológico pH 5.8.

4.- Grupo control MS, 30g/L de sacarosa y 8g/L de agar bacteriológico pH 5.8.

Estos cultivos se mantuvieron durante 11 meses en la cámara de incubación. Posteriormente se colocaron a temperatura ambiente con iluminación natural (día/noche) durante 4 semanas. Al término de éstas, las plantas fueron extraídas de los frascos, se enjuagaron con agua corriente para remover restos del medio de cultivo y se dejaron 36h sobre papel estroza. Posteriormente, se plantaron en charolas con cubiertas incoloras transparentes, con un sustrato mezcla de tezontle-tepojal-tierra negra (2-2-1) y fueron llevadas a un invernadero en donde las condiciones de luz, temperatura y humedad dependieron del estado del tiempo (Fig. 9). Los cultivos fueron regados con agua corriente semanalmente. Las primeras dos semanas las charolas

quedaron entreabiertas y seis semanas completamente destapadas. Se registró la sobrevivencia a las ocho semanas.

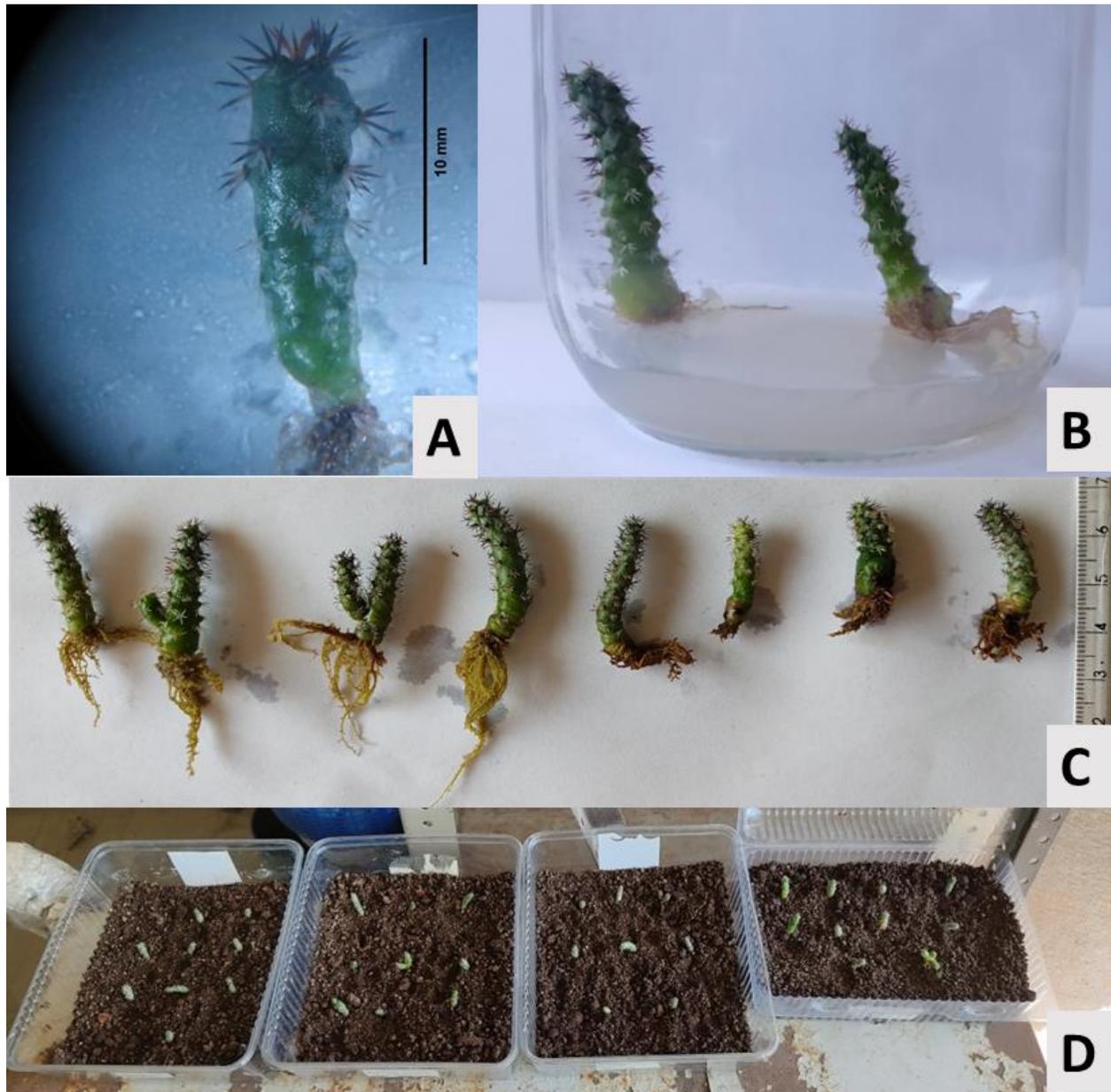


Figura 9. Proceso de aclimatización: A) Planta de *O. macdougallii* con dos días de haber iniciado la aclimatización *in vitro*; B) Plantas cultivadas *in vitro* previo a ser sacadas del frasco; C) Plantas fuera del frasco, se observa que algunas plantas generaron brote.

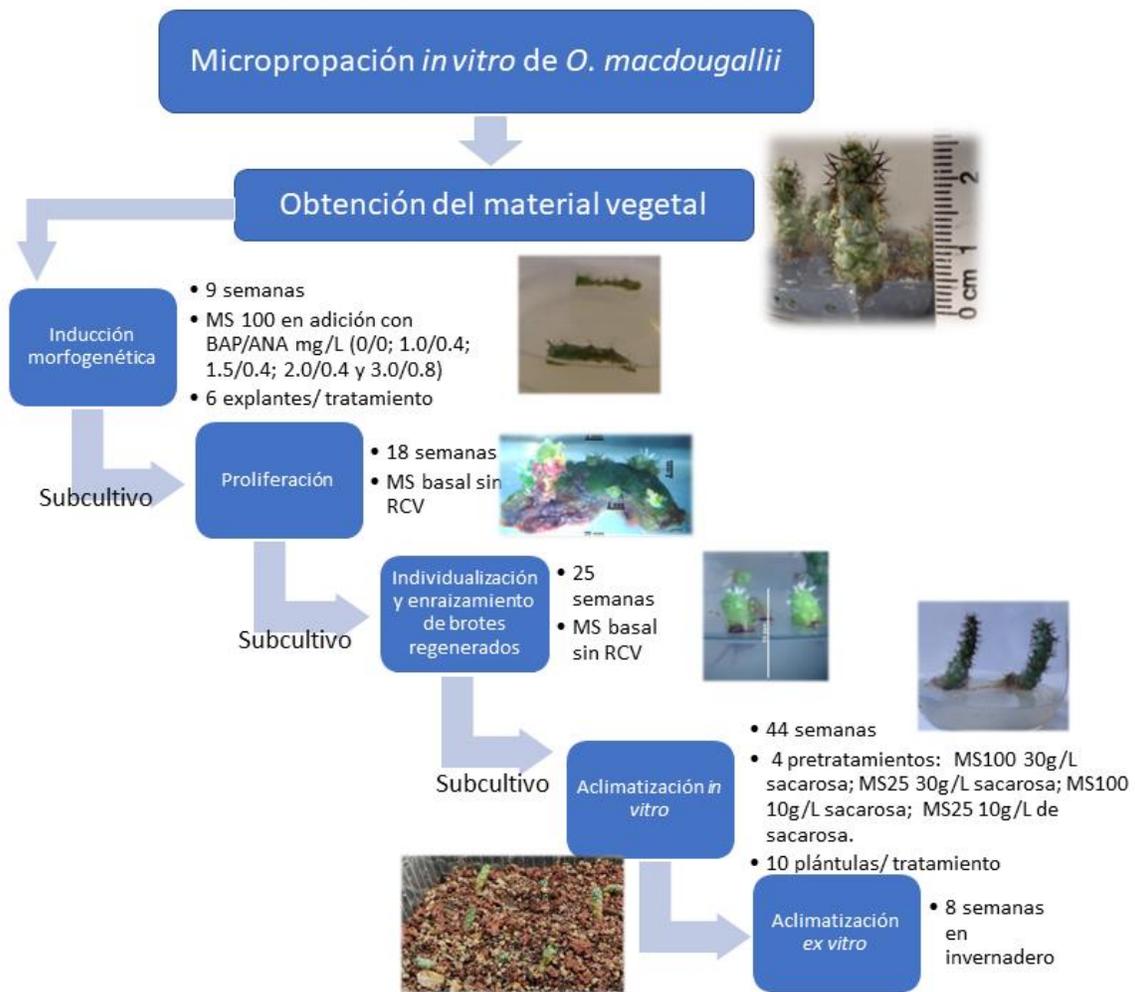


Figura 10. Diagrama general de la metodología experimental del cultivo de tallos de *O. macdougallii*

## Resultados

### Respuestas morfogénicas

En los segmentos de tallo, después de cuatro días de haber iniciado su cultivo, la primera respuesta que se observó fue el encorvamiento de la mayoría de los explantes de tallo, evidenciando crecimiento (elongación) de las células (“efecto domo”); algunos al perder sus puntos de apoyo quedaron sobre un costado sobre el medio de cultivo (Figs. 11A; 12A), adicionalmente se presentó una coloración rojiza en las zonas de cortes.

### Tratamiento 1: 1.0/ 0.4 mg/L (BAP/ANA)

Después de cuatro semanas de haber iniciado la inducción, se observó que se había formado callo de aspecto friable en pocas cantidades en las zonas de corte. En las zonas meristemáticas (areolas) aparecieron los primeros brotes; provenientes de areola, conforme fue avanzando el tiempo el número de brotes fue en aumento, además, se regeneraron algunos en zonas de tejido diferenciado como dermis o epidermis, pero a diferencia de los otros brotes éstos tenían una apariencia vítrea (Fig. 11B), es decir eran brotes hiperhidratados, mientras que los originados en areola tenían una apariencia consolidada (Fig. 11C) una epidermis con un color verde intenso, la presencia de areolas y espinas.

Después de nueve semanas que correspondieron al periodo de inducción se realizó un subcultivo, para dar iniciada la fase de proliferación, en donde el número de brotes generados fue mayor que en la primera fase, este periodo tuvo una duración de 18 semanas, el crecimiento en el número de brotes se observa en el gráfico 1. Cuando se hizo el cambio de los explantes a medio sin RCV, se individualizaron los brotes regenerados debido a que podían interferir con la regeneración de nuevos brotes. Los brotes continuaron su desarrollo, crecieron y generaron raíces de manera espontánea, es decir no necesitaron de algún RCV, éstas surgieron a los 11 días de haber sido separados del tejido madre (Fig. 11D).

Después de las dieciocho semanas el número total de brotes que se obtuvo de este tratamiento fue de 67, de 3 plantas iniciales. El enraizamiento de los brotes ocurrió eventualmente por lo que no se utilizaron RCV. A los brotes que se generaron se les individualizó y se colocaron en un medio de crecimiento sin RCV; después de 21 días, 60 (89%) generaron raíces, convirtiéndose en plantas (Graf. 6 y 7). Después de once meses de haber iniciado este tratamiento y habiendo pasado por inducción, proliferación y enraizamiento, el número total de brotes que se obtuvieron fueron 67 (los explantes iniciales siguieron generando brotes, pero en menor medida) de esos 67 brotes, 60 se pueden considerar plantas completas, porque presentaron dos ápices, el apical y el radicular, por lo que se consideraron adecuadas para ser aclimatizadas.

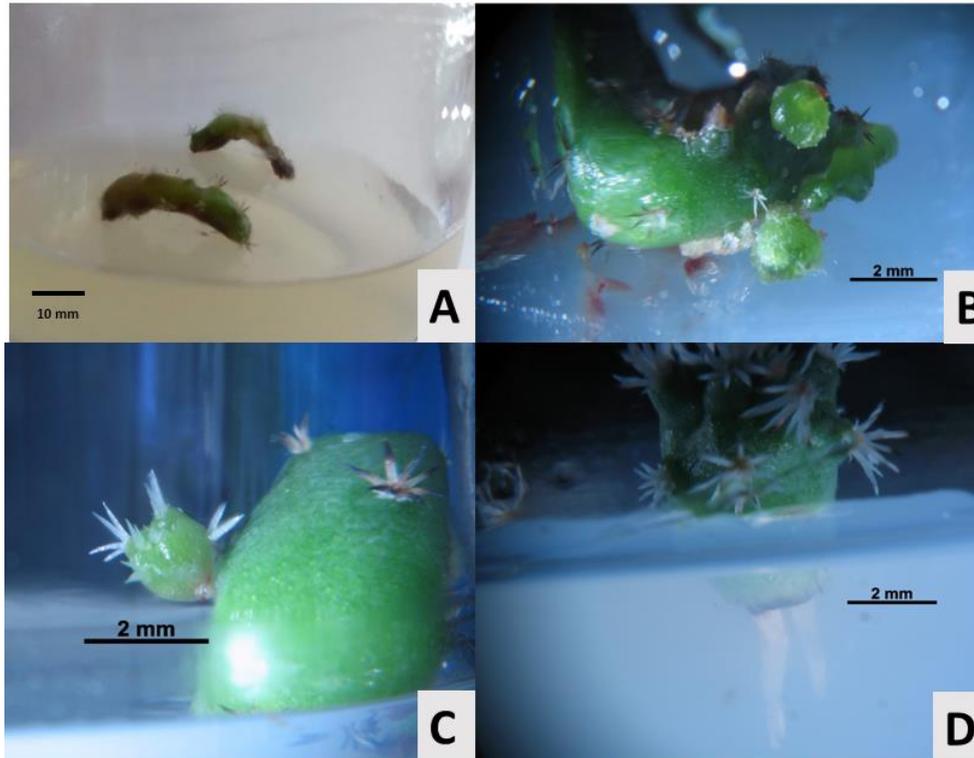


Figura 11. Cultivo in vitro de tallo de *O. macdougallii* del tratamiento 1; 1.0/0.4 mg/L (BAP/ANA)

A) Explantes de *O. macdougallii* con cuatro días de haber sido sembrados se observa el encorvamiento; B) Se observa la generación de brotes hiperhidratados con apariencia vítrea, después de cuatro semanas de iniciado el cultivo; C) Se observa la generación de un brote con una apariencia consolidada proveniente de una areola, después de tres semanas de iniciado el cultivo; D) Brote consolidado, se observa la aparición de las primeras raíces 21 días después de ser individualizados.

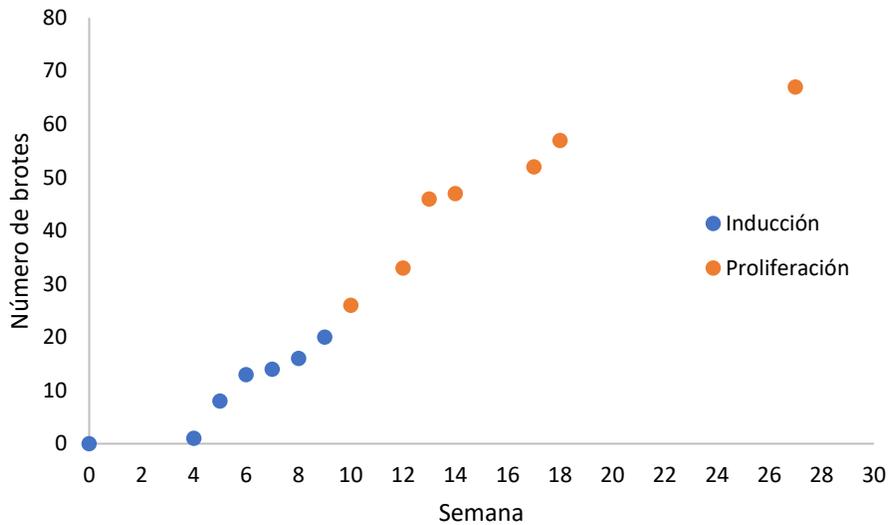


Gráfico 1. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de *O. macdougallii* en el tratamiento 1 (1.0/0.4 mg/L (BAP/ANA)).

### Tratamiento 2: 1.5/ 0.4 mg/L (BAP/ANA)

Después de 18 días se observó el crecimiento de callo de aspecto friable en las zonas donde se hicieron los cortes, se observó un abultamiento en las zonas meristemáticas (areolas). Después de cuatro semanas de haber iniciado la inducción surgió el primer brote de una areola. Después de seis semanas en el extremo inferior de un explante se regeneraron dos raíces una se regeneró de areola y la otra al parecer surgió de tejido vascular del explante (Fig. 12B) demostrando la totipotencialidad de las células vegetales. Durante el periodo de inducción se formaron 8 brotes, en todo el tratamiento, todos provenían de areola y presentaron una morfología similar. Algo destacable en este tratamiento fue el surgimiento de varios brotes de una misma areola como se puede observar en la Fig. 12 C y D, en esta misma foto se puede observar que la mayoría de los brotes surgieron de areola. En el gráfico 2 se registró el número de brotes en el periodo de inducción y en el de proliferación.

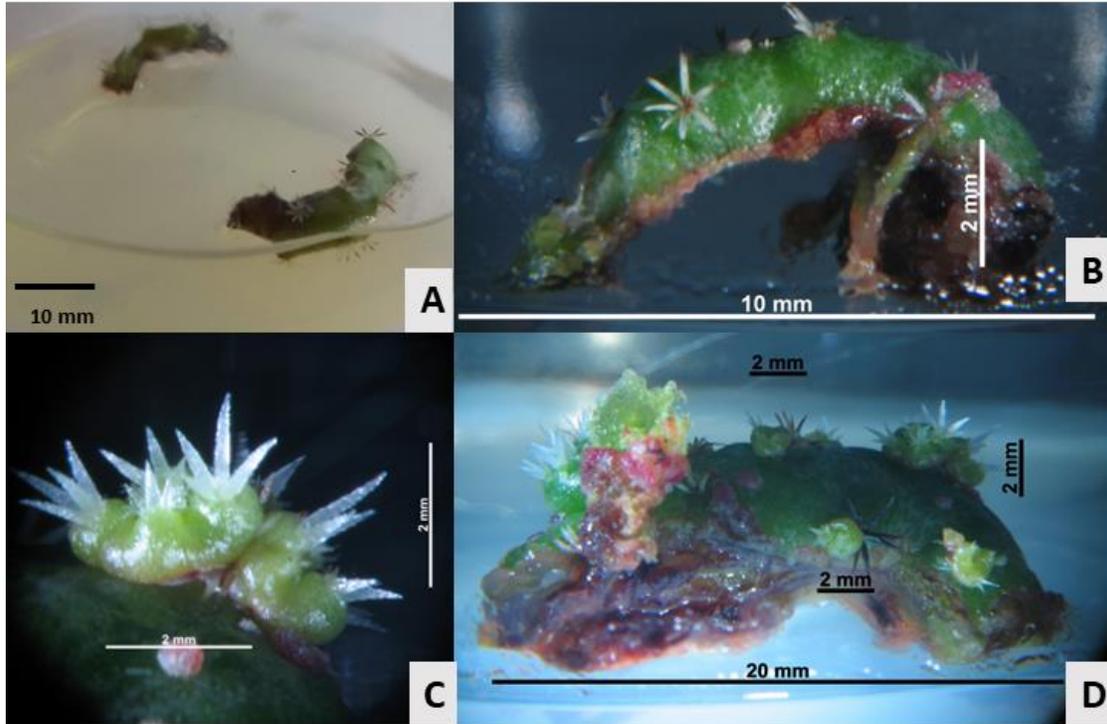


Figura 12. Cultivo *in vitro* de tallo de *O. macdougallii* del tratamiento 2 (1.5/ 0.4 mg/L (BAP/ANA)):

A) Explantes de *O. macdougallii* a cuatro días de haber sido sembrados, se observa el encorvamiento y la oxidación en un explante; B) Detalle de un explante en donde se observa la regeneración de una raíz a partir de una areola cuatro semanas después de ser sembrados; C) Detalle de una areola en donde surgieron más de un brote; D) Explante con múltiples brotes provenientes de areola.

En este tratamiento al término del periodo de proliferación el número total de brotes obtenidos fue de 27. Durante el periodo de enraizamiento todos los brotes generaron raíces 15 días después de haber sido individualizados. Algunos ya presentaban raíces antes de ser separados del explante original; cuando se colocaron en el medio para enraizar generaron nuevas raíces y las ya existentes crecieron y generaron raíces secundarias (Graf. 6 y 7).

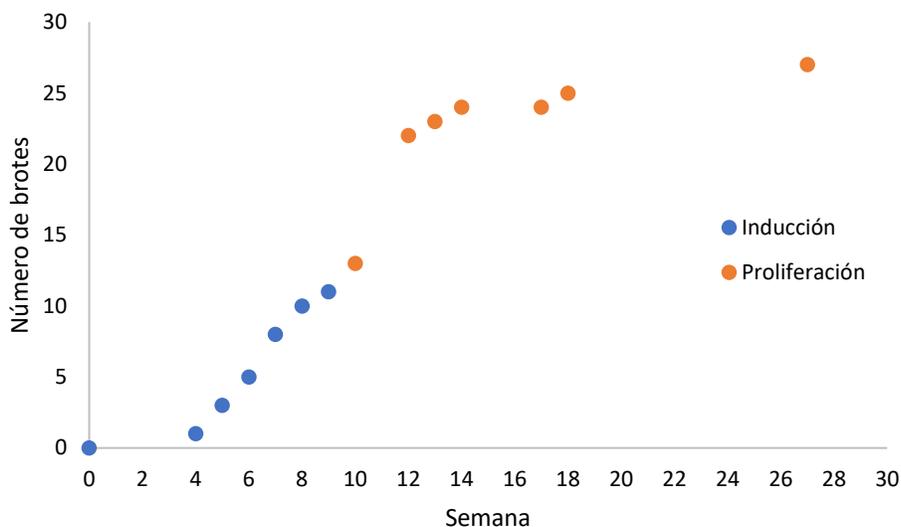


Gráfico 2. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de *O. macdougallii* en el tratamiento 2 (1.5/0.4 mg/L (BAP/ANA)).

### Tratamiento 3: 2.0/ 0.4 mg/L (BAP/ANA)

En el período de inducción la epidermis del explante tomó una coloración amarillenta rojiza (Fig. 13A). La regeneración de los primeros brotes ocurrió cuatro semanas después de iniciada la inducción, al final de ésta se habían formado 14 brotes.

La cantidad de callo que se generó en este tratamiento fue mayor que en tratamientos anteriores, este callo al igual que en los otros tratamientos presentaba un aspecto friable. Uno de los brotes que se individualizó presentó hiperhidratación (después de una semana de ser individualizado), aumentó de volumen, rompió la dermis y emergió callo, alrededor de las areolas del explante se generó callo, éste presentaba una coloración rojiza y aspecto friable. Después de cuatro meses de que a los explantes se les retiraron todos los brotes éstos se mantuvieron en un medio sin RCV, pero ya no generaron más brotes, todo el tejido se convirtió en callo, éste tenía un aspecto friable.

Después de 27 semanas de haber iniciado el periodo de inducción y concluido el periodo de proliferación el número de brotes que se obtuvieron en este tratamiento fue de 29 (Graf. 3), de éstos, 26 generaron raíz de manera espontánea en un medio MS sin RCV después de dos semanas de haber sido separados del explante inicial (Graf. 6 y 7).

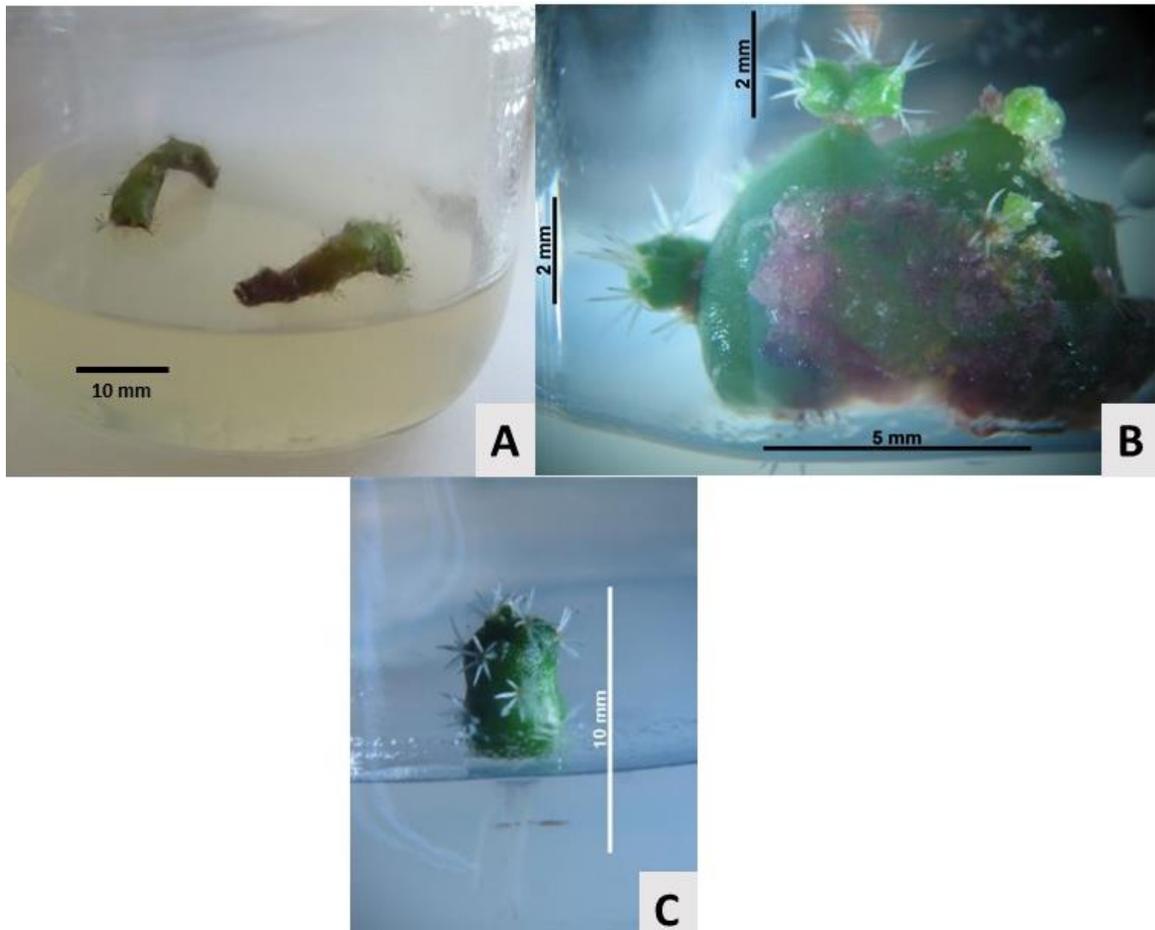


Figura 13. Cultivo *in vitro* de tallo de *O. macdougallii* en el tratamiento 3 (2.0/ 0.4 mg/L (BAP/ANA)):

A) Explantes ya encorvados, a cuatro días de haber sido sembrados; B) Explante en la fase de proliferación, se observa la generación de más de un brote por areola; C) Brote regenerado, se observa la presencia de las primeras raíces.

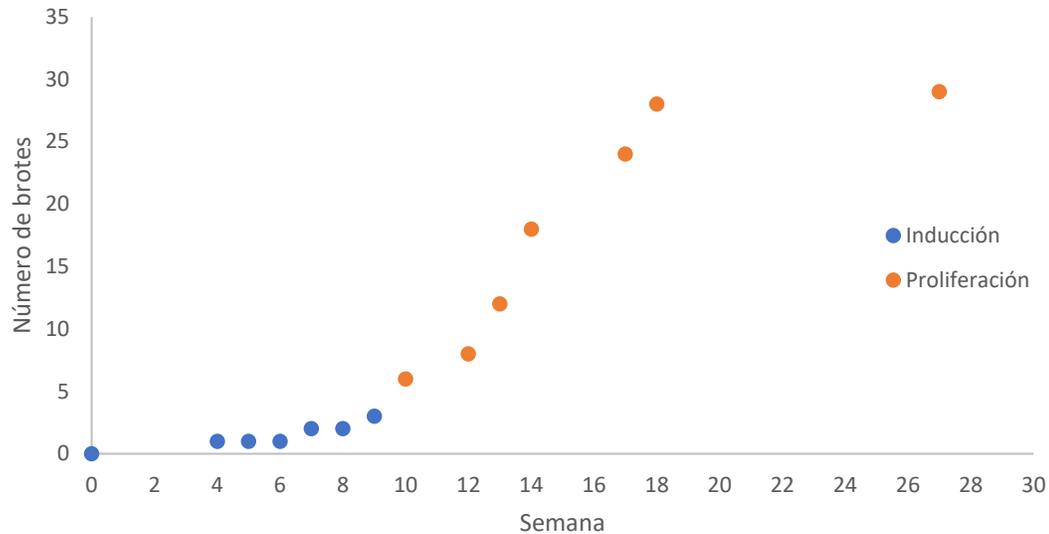


Gráfico 3. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de *O. macdougallii* en el tratamiento 3 (2.0/0.4 mg/L (BAP/ANA)).

#### Tratamiento 4: 3.0/ 0.8 mg/L (BAP/ANA)

A 11 días de la siembra, este tratamiento fue el primero en presentar la formación de nuevos brotes a partir de areolas (Fig. 14). A un mes de iniciada la inducción ya se habían formado dos brotes en el mismo explante. Asimismo, ya se presentaba el crecimiento de callo friable en las zonas de cortes. Previo al subcultivo para la fase de proliferación, a partir de callo compacto se desarrollaron brotes, los cuales tuvieron una condición hiperhidratada.

Cuando se hizo el cambio de medio de cultivo a un medio sin RCV (a fase de proliferación), el número de brotes era 11, pero 8 de éstos presentaban una apariencia hiperhidratada. Estos brotes se individualizaron, dejando a los explantes iniciales sin ningún brote. Los brotes que tenían un grado alto de consolidación generaron sus raíces de manera espontánea a las cuatro semanas de haber sido individualizados, mientras que los brotes hiperhidratados siguieron creciendo y generando más brotes, los cuales seguían presentando una apariencia hiperhidratada. El crecimiento de callo fue en aumento, en algunos casos fue tan grande que cubrió por completo a los explantes y éstos ya no regeneraron más brotes.

Los explantes que no fueron cubiertos por callo, regeneraron múltiples brotes, la gran mayoría de ellos fueron hiperhidratados, la aglomeración de éstos dificultó su conteo. Antes de realizar la individualización, algunos se reventaron convirtiéndose en callo. Cuando se realizó la individualización de los brotes para la fase de enraizamiento los brotes que tenían la apariencia vítrea no generaron raíces, mientras los que no tenían esa apariencia, considerados como consolidados, sí generaron sus raíces, de manera espontánea.

Este tratamiento fue el que regeneró el mayor número de brotes, con un total de 77 después de 27 semanas desde que se inició la inducción, en este número se están considerando los brotes hiperhidratados; sin embargo, este tratamiento fue el que generó el menor número de plantas, debido a que solo 9 de 77 brotes generaron raíz (Graf. 6 y 7).

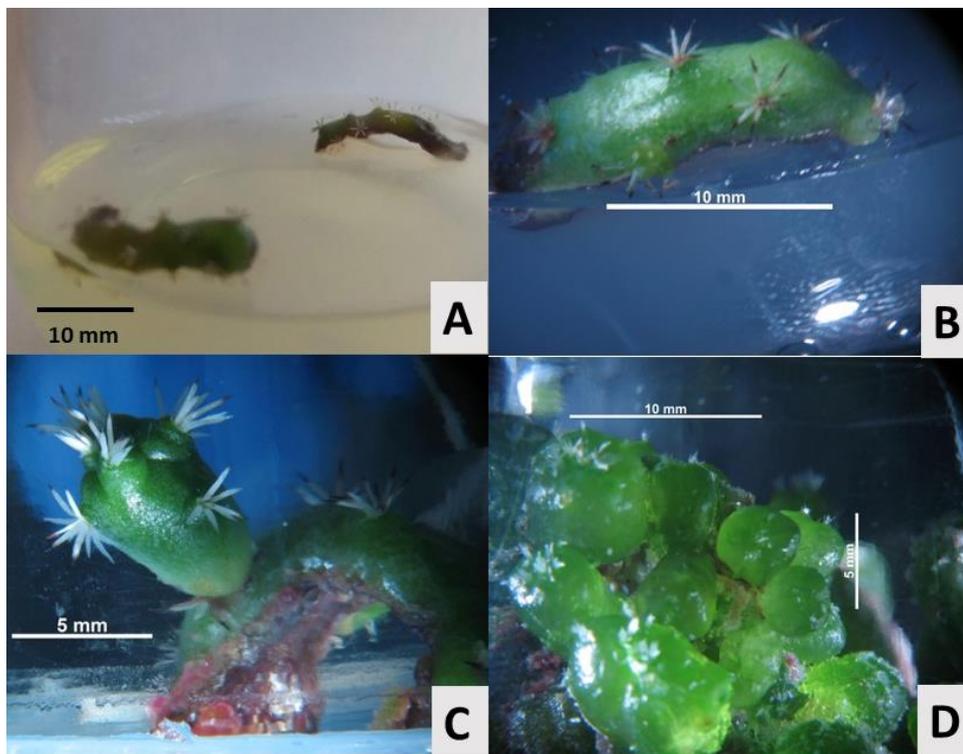


Figura 14. Cultivo in vitro de tallo de *O. macdougallii* en el tratamiento 4 (3.0/0.8 mg/L (BAP/ANA)):

*Explantes curvados a cuatro días de haber sido sembrados; B) Primeros brotes axilares a cuatro semanas del inicio de la siembra; C) Brote consolidado con cuatro semanas de haber sido regenerado; D) Múltiples brotes hiperhidratados provenientes de tejido diferenciado del explante inicial.*

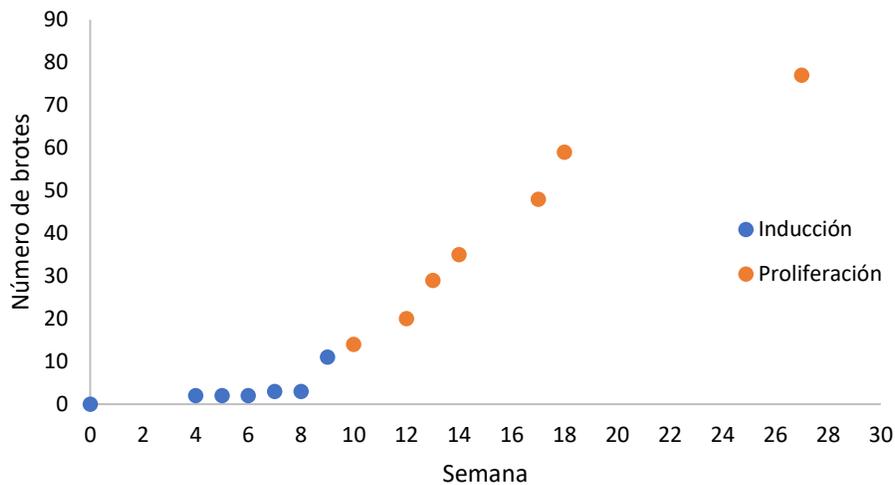


Gráfico 4. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de *O. macdougallii* en el tratamiento 4 (3.0/0.8 mg/L (BAP/ANA)).

## Control

Con la curvatura de los explantes, también se observó la oxidación de los tejidos en las zonas de corte, que cambiaron de verde a un rojo/café. Dos semanas y media después de la siembra de los explantes aparecieron los primeros brotes provenientes de areolas (Fig. 15B). Esta respuesta continuó por varias semanas, aumentando el número de brotes (Fig. 15C). A algunos explantes les surgieron unas raíces que no provenían de lo que fue la parte basal de la planta, sino que provenían de la parte media del explante, (“raíces adventicias”) posiblemente del tejido vascular (15D). Al realizar el cambio de medio a las nueve semanas de iniciados los cultivos, los brotes que se había formado, fueron individualizados, éstos generaron su raíz de manera espontánea después de dos semanas de estar en un medio sin RCV.

Las “raíces adventicias” de algunos explantes fueron en aumento en la etapa de proliferación (Fig. 15D); al igual que los brotes regenerados (Gráfica 5). El número total de brotes generados en este tratamiento fue de 70 después de 27 semanas de iniciada la inducción colocándose en el segundo puesto por número de brotes. Hubo explantes que generaron brotes que no provenían de areolas posiblemente de un tejido

epidérmico, algunos de éstos presentaron una apariencia vítrea, es decir presentaron un grado de hiperhidratación (Fig. 15F). Algunas areolas generaron más de un brote, llegaron a tener hasta tres brotes por areola (Fig. 15G). De los 70 brotes que se individualizaron 34 generaron sus raíces, éstas se formaron después de 52 semanas de iniciados los cultivos, los brotes que presentaron hiperhidratación no generaron raíces (Grafico 6 y 7).

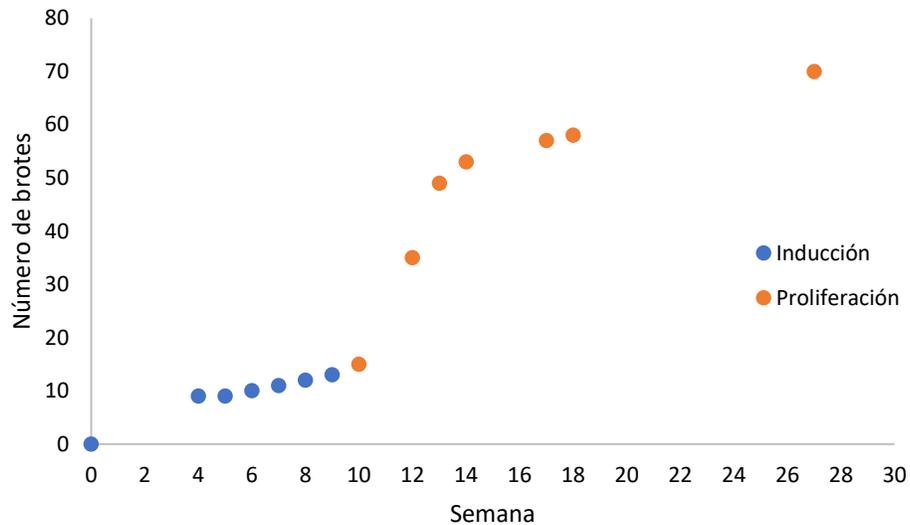


Gráfico 5. Formación de brotes en los dos primeros periodos en el cultivo in vitro de tallos de *O. macdougallii* en el grupo control.

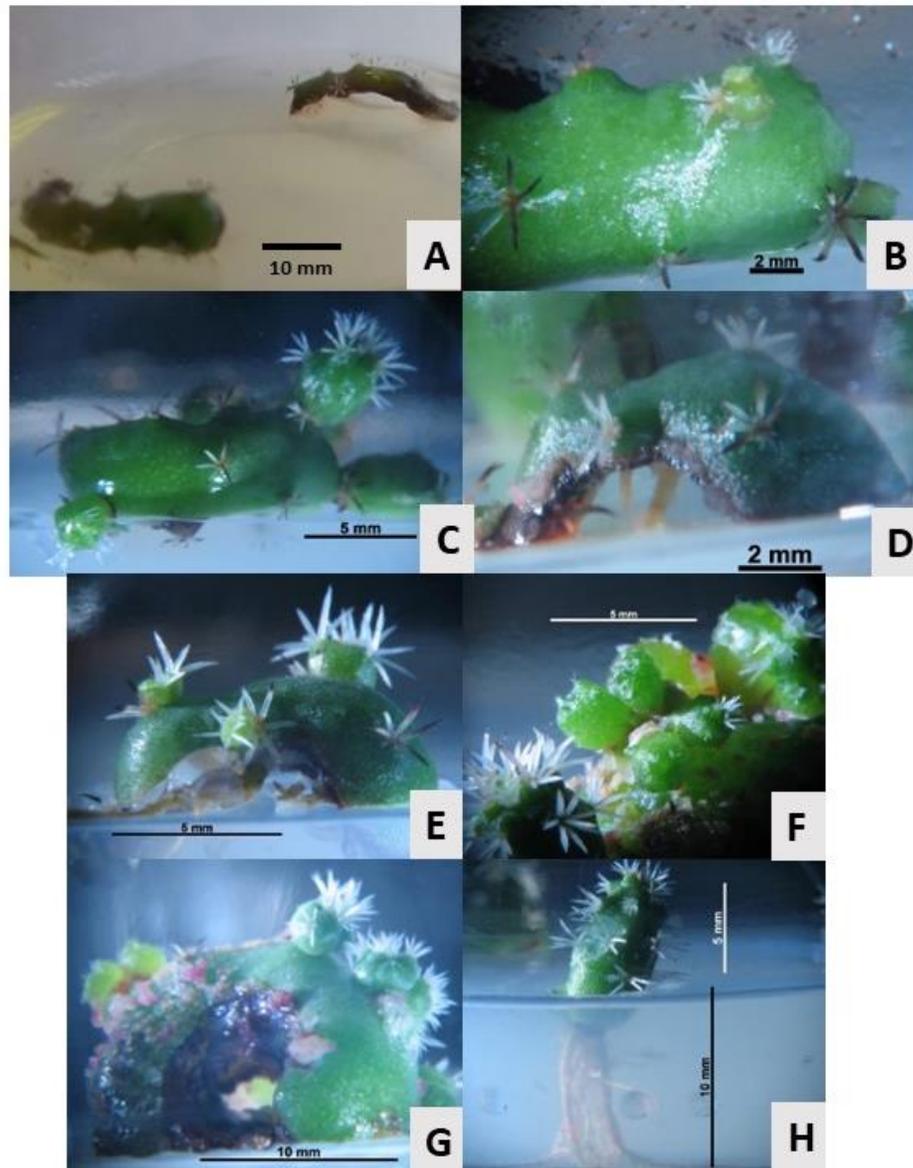


Figura 15. Distintos momentos del cultivo in vitro de tallo de *O. macdougalii* en el grupo control

A) Primeras respuestas de los explantes, se observa el efecto domo y la oxidación en algunas partes del tejido; B) Primeros brotes provenientes de areola a un mes de haber sido sembrados; C) Brotes consolidados provenientes de areola 20 días después de B; D) Se observa el surgimiento de estructuras parecidas a raíces, de la parte media del explante; E) Se observa el crecimiento de las raíces que surgieron del tejido vascular y los brotes consolidados provenientes de areola; F) Se observan los brotes hiperhidratados aglomerados; G) Explante con varios brotes provenientes de una sola areola; H) Brote con raíz con cuatro semanas después de haber sido individualizado.

En el análisis estadístico de Kruskal-Wallis de los resultados obtenidos señalo que al adicionar una concentración mayor de RCV, se puede observar que no hay diferencias entre los tratamientos 4 y 1, la producción de brotes entre estos tratamientos se puede deber a que a una alta concentración de RCV la regeneración de brotes es alta, pero la mayoría de estos presentan hiperhidratación, mientras que el tratamiento 1 fue el mayor número de brotes consolidados presente, es por esto que el análisis los presenta como un solo grupo, y agrupa al tratamiento 1, el control y el tratamiento 3 como un segundo grupo, en donde no se presentan diferencias, y por último al control, al tratamiento 3 y al tratamiento 2 como un tercer grupo. Entre el tratamiento 4 y el tratamiento 2 son los que presentan la mayor diferencia.

*Cuadro 2. Promedio de rangos para la Prueba de Kruskal-Wallis*

Tratamiento (BAP/ANA mg/L)	Promedio de rangos	
Tratamiento 4 (3.0/0.8)	34.0	a
Tratamiento 1 (1.0/0.4)	26.1	ab
Control (0.0/0.0)	23.0	bc
Tratamiento 3 (2.0/0.4)	16.2	bc
Tratamiento 2 (1.5/0.4)	13.0	c

Cuadro 3. Cultivo in vitro de *O. macdougallii*, después de 52 semanas de iniciada la induccion

Tratamiento BA /ANA mg/L	1.0/0.4	1.5/0.4	2.0/0.4	3.0/0.8	Control	TOTAL
Número de brotes	67	27	29	77	70	270
Número de brotes enraizados	60	27	26	9	34	156
Brotos por explante	11.17	4.50	4.83	12.83	11.67	18
Porcentaje de brotes enraizados	90%	100%	90%	12%	49%	58%

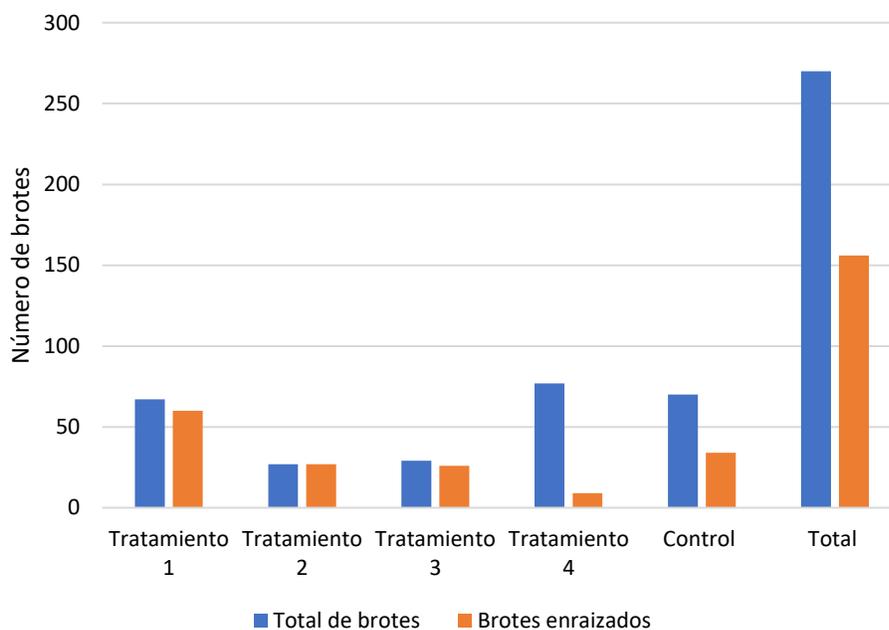


Gráfico 6. Conteo final de brotes después de 52 semanas de iniciada la inducción en los distintos tratamientos del cultivo in vitro de tallos de *O. macdougallii*.

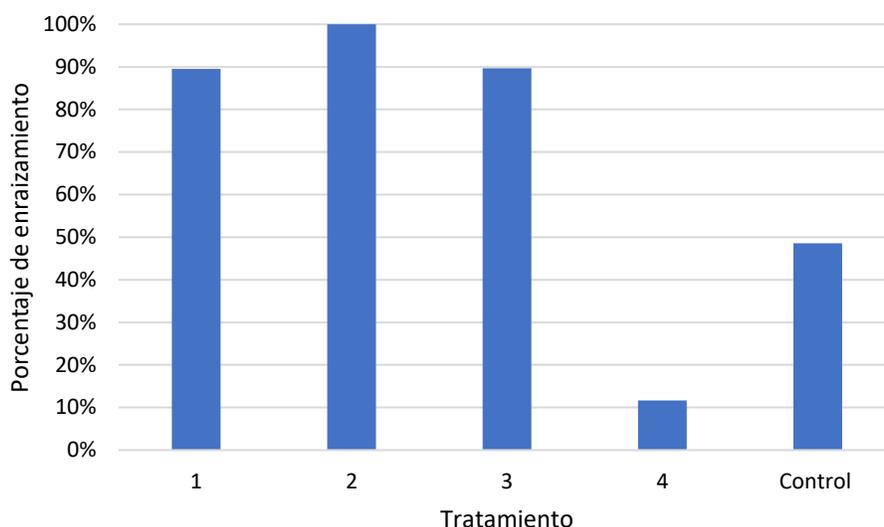


Gráfico 7. Porcentaje de brotes enraizados por tratamiento después de 52 semanas de iniciada la inducción.

## Aclimatización

Después de los 11 meses de haber iniciado la aclimatización con el pretratamiento *in vitro* las plantas continuaron con la generación de raíces y aumentando en tamaño. Debido a la Pandemia por Covid-19, el seguimiento de los cultivos se interrumpió junto con el registro de los resultados, cuando las condiciones fitosanitarias y las autoridades permitieron el retorno a las actividades presenciales se continuó con la aclimatización. En la Figura 16 se observa las condiciones de las plantas al momento en el que se les retiró el medio de cultivo, se observa el desarrollo de raíces en la mayoría de las plantas, algunas de ellas generaron brotes, provenientes de areolas como se observa en la sección A que corresponde al grupo control, al no haberles podido dar un seguimiento constante a los cultivos, algunas plantas no sobrevivieron debido a que en el medio en el que se mantuvieron tuvo contaminación de hongos, lo que provocó que algunas plantas se perdieran, en este grupo dos plantas no sobrevivieron; en la sección B, que corresponde a las plantas que se sembraron en un medio MS 25%, estas plantas no presentaron surgimiento de brotes, las raíces de estas son pequeñas de color café oscuro, algunas no presentan raíces, debido a que al momento de ser extraídas del medio éste ya se encontraba con un nivel de humedad bajo y las raíces se adhirieron al frasco; en la sección C, correspondiente a las plantas que se sembraron

en medio MS 100 reducido en sacarosa a 10g/L, las raíces de las plantas son más largas en comparación al tratamiento B, se observa el surgimiento de un brote en una planta que casi alcanza el tamaño de la planta madre, en este tratamiento se perdió una planta debido a la contaminación, se puede observar que tres brotes tuvieron un crecimiento anormal del ápice (Fig. 16C); en la última sección que corresponde a plantas que se sembraron en un medio MS 25% adicionado con 10g/L de sacarosa, se observan plantas más uniformes, con raíces delgadas, algunas presentan una coloración rojiza en el tallo de la parte media a la parte basal, en este tratamiento tampoco hubo el surgimiento de brotes.

Una vez en el sustrato en charolas el seguimiento de los cambios fue semanalmente durante ocho semanas, al final de las ocho semanas el porcentaje de plantas sobrevivientes por tratamiento se presenta en el gráfico 8.



Figura 16. Plántulas de *O. macdougallii* cultivadas *in vitro* fuera sus frascos: A) Plantas del grupo control; B) Plantas de la prueba en disminución de sales al 25% de su concentración original; C) Plantas de la prueba con sacarosa a 10g/L; D) Plantas de la combinación de ambas pruebas (1 y 2).

Las plántulas que se utilizaron para todo el proceso de la aclimatización provenían de los cuatro tratamientos previos realizados en esta investigación, todas tenían 25 semanas de haber sido individualizadas para la fase del enraizamiento sembradas en un medio sin RCV.

## Control

Cuatro semanas después de haber sido plantadas, se observó una ligera coloración rojiza en la base del tallo de los individuos sobrevivientes. Una semana después, se observó la generación de nuevas areolas en el ápice de las plantas. Posteriormente el número de areolas fue en aumento, lo que evidenció el crecimiento de las plantas. Después de 8 semanas en condiciones de invernadero se registró un 62.5% de plantas sobrevivientes.

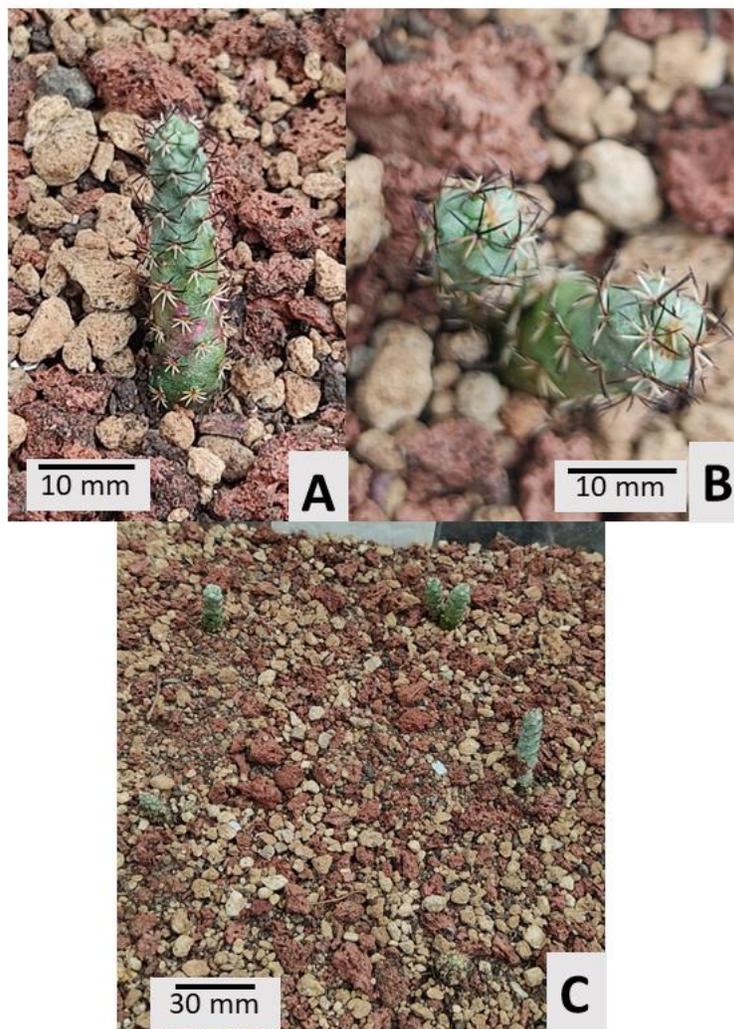


Figura 17. Plantas del grupo Control.

se observa: A) Coloración rojiza en la base del tallo; B) Plantas con nuevas areolas en el ápice del tallo; C) Plantas sobrevivientes después de 8 semanas.

### Prueba 1: Medio MS 25%

Después de cuatro semanas de estar en sustrato comenzó a verse una coloración rojiza en la base del tallo de las plantas, una semana posterior esa coloración fue más evidente, una semana después aparecieron nuevas areolas y en las semanas posteriores aparecieron más, después de ocho semanas sobrevivieron 9 plantas de las 10 iniciales. En esta prueba se reportó el mayor porcentaje de supervivencia con 90%.

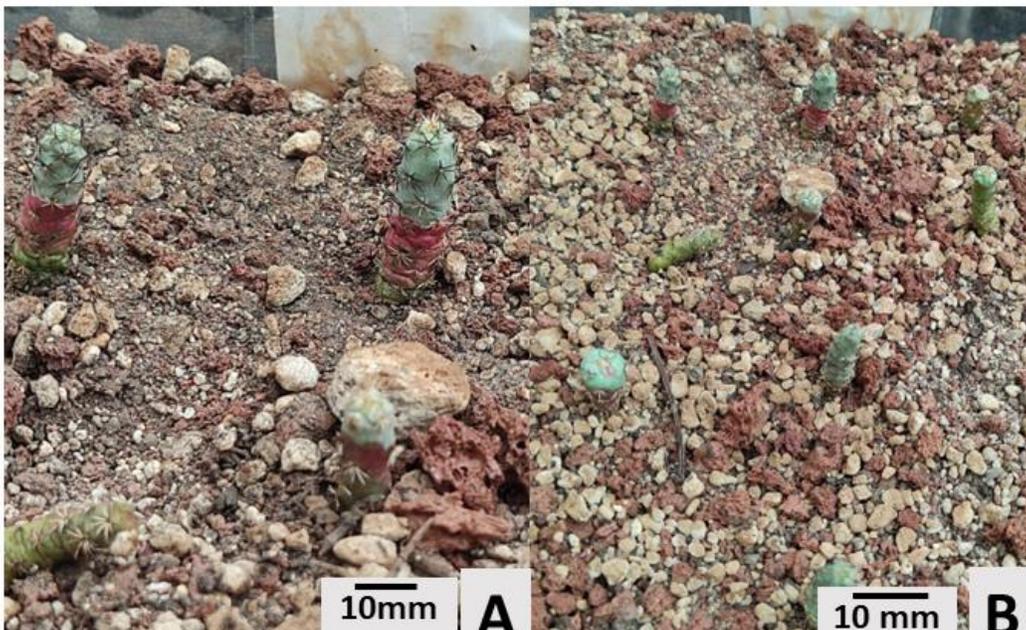


Figura 18. Plantas aclimatizadas con una disminución de sales al 25% en el Medio de cultivo *in vitro*

A) Plantas en charola con cinco semanas; B) Plantas con ocho semanas de estar en el sustrato.

### Prueba 2: Reducción de sacarosa a 10g/L

En esta prueba fue en donde se reportó el menor número de supervivencia de plantas con un 33.3%, además de que en ninguna de las plantas se notó la coloración rojiza en la base del tallo como en los demás ensayos. A la tercera semana de permanecer en la charola y en invernadero, algunas de las plantas fueron consumidas por un roedor, que dañó parte del tallo de 6 plantas, las cuales no sobrevivieron (Fig. 19C).

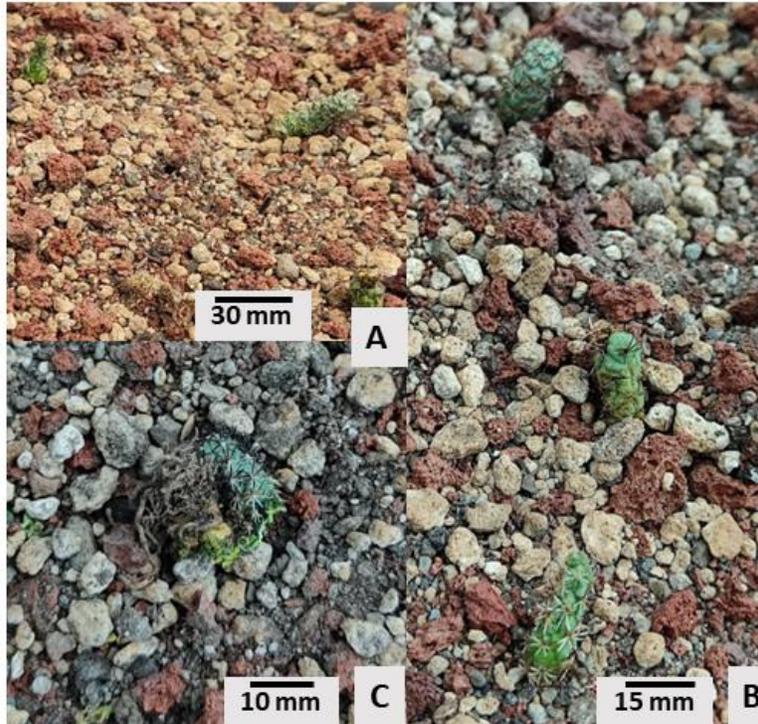


Figura 19. Plantas aclimatizadas de la prueba en un medio con 10 g/L de sacarosa

A) Plantas aclimatizadas a cuatro semanas de estar en el sustrato; B) Plantas sobrevivientes a ocho semanas de estar en sustrato; C) Plantas después de haber recibido un ataque de un roedor.

### Prueba en un medio MS 25%, adicionado con 10g/L de sacarosa

En esta prueba a cuatro semanas de que las plantas se colocaron en sustrato, comenzaron a presentar una coloración rojiza en la base del tallo, en la semana número seis comenzaron a presentar nuevas areolas en el ápice, además, al parecer las raíces formadas en el cultivo *in vitro* fueron reemplazadas por nuevas raíces (Figura 20 B-C). El número de plantas que sobrevivieron en este tratamiento fue de 8 plantas de 10, siendo la segunda prueba con el porcentaje más alto de sobrevivencia (80%).

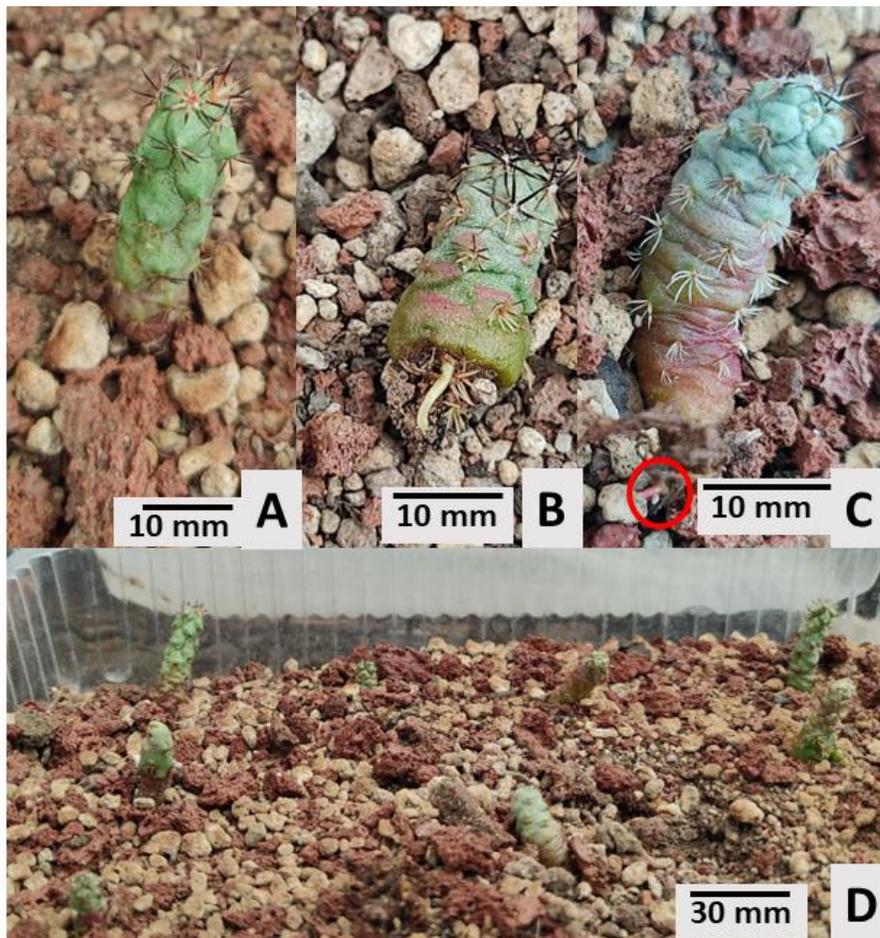


Figura 20. . Plantas de *O. macdougallii* de la prueba en un medio MS 25% adicionado con 10g/L de sacarosa: A) Planta con nuevas areolas a siete semanas de haber sido colocadas en sustrato; B) Detalle de una planta con una nueva raíz; C) Planta en donde se observa la coloración rojiza del tallo, la regeneración de una nueva raíz (en rojo) y las raíces muertas generadas en el cultivo in vitro; D) Plantas con ocho semanas de haber sido colocadas en sustrato.

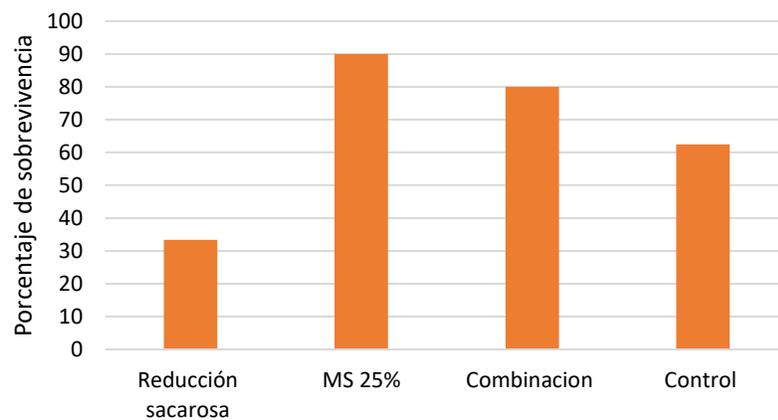


Gráfico 8. Porcentaje de plantas sobrevivientes después de dos meses de iniciada la aclimatización

Cuadro 4. Resultados de la aclimatización con 44 semanas *in vitro* y 8 semanas *ex vitro*

	Tratamientos				
	Medio MS 25%	Reducción de Sacarosa	Combinación	Control MS 100%	TOTAL
Plántulas aclimatizadas	8/10	10/10	9/10	10/10	37/40
Plantas sobrevivientes	5/10	9/10	3/10	8/10	25/40
Porcentaje de sobrevivencia	63%	90%	33%	80%	68%

## Discusión

Arellano-Perusquia y Estrada-Luna en 2012 reportaron el uso de ANA y BAP en altas y bajas concentraciones para la micropropagación de *O. macdougallii*, hicieron pruebas con distintas combinaciones de esos dos RCV. Se formó callo en la zona de corte, la organogénesis de brotes y raíces fue evidente a los 116 días de haber iniciado los ensayos, en todos los tratamientos que contenían auxina en presencia o ausencia de BAP. En el presente estudio la generación de callo ocurrió dentro de los primeros 28 días, así como la formación de los primeros primordios de brotes provenientes de areolas.

Con la combinación de 0.3/3 mg/L (ANA/BAP), los explantes produjeron callo y brotes a los 56 días de cultivo, estos brotes fueron provenientes de tejido de epidermis y la zona basal del explante (Arellano-Perusquia y Estrada-Luna, 2012), algo similar ocurrió en la presente investigación en el tratamiento 4 (3.0/0.8 BAP/ANA) donde se generaron

brotos de la epidermis, pero éstos presentaban una apariencia vítrea, no se consolidaron y no generaron raíces; estas respuestas no fueron reportadas por Arellano-Perusquia y Estrada-Luna en 2012. Arellano-Perusquia y Estrada-Luna reportaron la generación de 5 a 7 brotes en los tratamientos con 1 mg/L de ANA y 3, 4.5 y 6 mg/L de BAP, asimismo señalaron que en el tratamiento con 3mg/L de BAP fue el que produjo los brotes más largos. (Grafico 7), esto pudo haber ocurrido debido a que las altas concentraciones RCV en específico de citocininas promueven la diferenciación de brotes .

Arellano-Perusquia *et al.*,2013 reportaron que en concentraciones elevadas de BA (4.3 y 5.7mg/L) , se formaron brotes crestados o monstruosos como ellos lo indican, en tanto que, en la presente investigación, a concentraciones elevadas de RCV (3.0/0.8 ANA/BAP) (Gráfico 4), la presencia de brotes hiperhidratados fue la que dominó sobre los brotes consolidados.

Uno de los requisitos para la propagación de *O. macdougallii* es una concentración baja de auxinas (0.24, 0.81 y 2.4 mg/), para la mayoría de las cactáceas se reporta el uso entre 0.4 y 4.1 mg/L de ANA cuando se realiza su propagación *in vitro* (Arellano-Perusquia *et al.*, 2013), en el presente estudio las concentraciones de auxina utilizada fueron de 0.4 y 0.8 mg/L, utilizando como referencia reporte de Arellano-Perusquia *et al.*, 2013, se obtuvo como resultado que una menor concentración de RCV beneficia la obtención de brotes consolidados.

Arellano-Perusquia y colaboradores en 2013 indicaron que para la producción de brotes en *O. macdougallii* se logró con la interacción entre auxina-citocinina, pero en la presente investigación el ensayo del grupo Control, en donde no se aplicaron RCV, se obtuvo el segundo mayor promedio de brotes regenerados por explante (Cuadro 2) esto debido a que la activación de yemas axilares ocurre probablemente al eliminar la dominancia apical y a la concentración interna de RCV del explante.

Los primordios de los brotes se observaron como un grupo desorganizado de estructuras, y después de cinco semanas, estos primordios se convirtieron en

estructuras organizadas con pequeños tubérculos colorados con el típico color verde oliva (Arellano-Perusquia *et al.*, 2013), mientras que los brotes generados en la presente investigación el color verde oliva lo adquirieron hasta que las plantas se aclimatizaron, esto se puede atribuir probablemente a que las condiciones de luz y temperatura en el invernadero promueven la coloración natural de las plantas.

Machado y Prioli en 1996 realizaron la propagación de *Ce0.24reus repandus* a partir de explantes de ápices y tallos, en donde la activación de areolas y posterior regeneración de brotes solo ocurrió en los tallos, de manera similar Velázquez en 2011, realizó el cultivo de *Escontria chiotilla* a partir de tres diferentes tipos de explantes: apicales, basales y medios, y determinó que las zonas medias fueron las más regenerativas, en donde se formaron brotes a partir de la activación de areolas, estos resultados son similares a los de este estudio debido a que todos los brotes que se regeneraron surgieron de los tallos y de la activación de areolas.

Se considera que las plantas regeneradas de yemas axilares (en el caso de las cactáceas estas yemas serían las areolas), con frecuencia tienen una estabilidad genética mayor, que las regeneradas a partir de cultivos de callo, siendo éstas genéticamente inestables ya que pueden presentar variación somaclonal (Machado y Prioli, 1996; De la Rosa-Carrillo *et al.*, 2012).

Arellano y Perusquia en 2013, reportaron que a altas concentraciones de BA se induce la formación de brotes en *O. macdougallii* de apariencia normal y de brotes fasciados con una constitución más robusta. Esta variación es el resultado de cambios en la fisiología de las plantas producidas por las condiciones ambientales o el efecto de los RCV, en particular de las citocininas o cambios en factores genéticos tal como la activación y expresión de la familia de genes CLAVATA (Arellano y Perusquia, *et al.*, 2013; Iliev y Kitin 2011). Sin embargo, en el presente estudio no se presentó este fenómeno de fasciación, pero si hubo la regeneración de brotes hiperhidratados en el tratamiento que contenía las concentraciones más altas de RCV, mientras que en los otros tratamientos los brotes hiperhidratados provenían de tejidos que no eran areolas, estas ideas se unen al complementar que los brotes que no provienen de yemas

axilares suelen ser genéticamente menos estables debido a un fenómeno conocido como variación somaclonal, Sala y Brava en 2003 mencionan que en el proceso de organogénesis indirecta a menudo ocurren estos cambios genéticos, expresando características diferentes que no se presentan en la naturaleza.

La regeneración de brotes a partir de areolas se ha reportado en diversos estudios *in vitro*, Fernández en 2014 reportó la formación de brotes en *Backebergia militaris* a partir la activación de areolas tanto en explantes basales y apicales en brotes obtenidos de cultivo *in vitro*, a diferencia de plántulas de invernadero en donde solo se obtuvieron brotes en la parte lateral del tallo. *Mammillaria bombycina* generó brotes tanto de explantes apicales como de otras partes del tallo, después de 40 días de estar en el medio de inducción (Yañez, 2011).

El uso auxinas y citocininas para la propagación *in vitro* requiere de un balance entre ambos RCV, ya sea para el cultivo de cactáceas o de cualquier otra planta. En algunas especies la activación areolar para la formación de brotes ocurre solo con la adición de citocininas (Arellano-Perusquia, *et al.*, 2013), sin embargo, en el presente estudio la formación de brotes se logró en un medio con ausencia de RCV.

Ruvalcaba-Ruiz y colaboradores en 2010 reportaron la propagación de *Coryphanta retusa* usando BAP y ANA, en donde los tratamientos que produjeron el mayor número de brotes fueron los que contenían 2.0 y 3.0 mg/L de BAP en ausencia de ANA, regeneraron entre 6-10 brotes por explante. En cultivos de *Browningia candelaris* la mejor respuesta se obtuvo en un medio adicionado con 0.5 mg/L de BA, produciendo 8.4 brotes por explante (Sánchez-Morán y Pérez-Molphe-Balch, 2007). Un número alto de brotes por explante se obtuvo en cultivos de *Mammillaria schiedeana*, donde el medio con una combinación de 1.0 mg/L de BA y 0.1 mg/L de ANA, se obtuvieron en promedio 22.4 brotes por explante, después de 11 semanas de cultivo (Soria-Campos *et al.*, 2013), estos resultados demuestran una variedad de respuestas entre las distintas especies, pues en *O. macdougalii* el tratamiento que dio el promedio más alto por explante, fue el que tuvo la concentración más alta de RCV (3.0/0.8 mg/L (BA/ANA)), pero muchos de ellos presentaron hiperhidratación, Quiala y colaboradores

en 2009 reportaron que en *Pilosocereus robinii* se obtuvo un alto número de brotes con una concentración de 3.0 mg/L de 6-BAP, pero recomendaron utilizar la mitad de la concentración, ya que así se podrían prevenir problemas de hiperhidratación y variación somaclonal.

Fernández en 2014 realizó pruebas en *Backebergia militaris* utilizando tres tipos de citocininas Kinetina, BA y metatopolina, donde el uso de BA produjo tres brotes, pero indicó que para tomar una decisión más certera sobre cual regulador podría ser el mejor para la regeneración de brotes en la especie se tienen que realizar más pruebas, la activación de las areolas ocurrió después de 38 días de iniciados los cultivos, y después de un año de iniciar el cultivo seguían observándose nuevas respuestas. *Aztekium valdezii* tuvo como respuesta a un tratamiento con 1/0.2 mg/L de BAP/ANA, la formación de callo y la regeneración de raíces y brotes, donde éstos últimos se obtuvieron mediante vía indirecta, es decir provinieron de la diferenciación de callo, no hubo activación de areolas (Vega, 2019).

El uso de BAP y ANA (2.0/0.5mg/L) en *Astrophytum asterias* reportó la formación de callo y la regeneración de brotes de tejido vascular después de tres meses de iniciada la inducción, no hubo activación de areolas, el callo en este tratamiento tuvo el crecimiento más rápido y masivo, el callo comenzaba a crecer en las zonas de corte (Gaona, 2018). Pérez, *et al.* 1998 reportaron la propagación de 21 especies de cactus en medio MS suplementado con BA y ANA, reportaron la generación de callo en las zonas de corte y la regeneración de brotes provenientes de yemas axilares (areolas) en todas las especies.

En el presente estudio, para el enraizamiento de los brotes obtenidos de *O. macdougallii* no se usó ningún RCV, debido a que se observó que los brotes generaban su raíz de manera espontánea, esto debido probablemente a la producción interna de RCV, una vez que se hacía la individualización de estos y se colocaban en un medio nuevo.

Arellano-Perusquia y Estrada-Luna en 2012, enraizaron brotes de *O. macdougallii* en un medio MS al 50% adicionado con 1mg/L de ANA y 3mg/L de BAP, indicaron que con la adición de IBA a 1.2 mg/L el proceso rizogénico se mejoró con mayor número de raíces y de brotes enraizados. Distintas especies responden a distintos reguladores para la generación de raíces, por ejemplo, *Turbinicarpus sp.* en un medio adicionado con AIB o AIA generó callo en la zona basal, sin la aparición de raíces, mientras que para *Mammillaria herrerae*, *Mammillaria theresae* y *Melocactus curvispinus*, la adición de AIB en el medio promovió el enraizamiento en 50% de los brotes que se habían generado, mientras que para *Polaskia chichipe* el porcentaje de brotes enraizados fue del 100%.

Arellano y colaboradores en 2013 reportaron que *O. macdougallii* podría presentar raíces adventicias en un medio sin RCV. Algunos brotes en condiciones de invernadero que son sometidos a corte de propagación generan sus raíces de manera espontánea sin la necesidad de agregar RCV, esto debido a que la concentración de auxinas endógenas promueve el enraizamiento (Jackson, 1986).

La formación de raíces en *O. macdougallii* se reportó por Arellano y colaboradores 2013 a los 50 días de haber iniciado la inducción en el medio adicionado con AIB; en tanto que en la presente investigación los brotes formaron raíces de manera espontánea a dos semanas de haber sido individualizados. Lema-Ruminska y Kulus en su revisión de 2014, indicaron que en algunas ocasiones no es necesaria la inducción de la formación de raíces, ni la modificación del medio, ya que algunas especies de cactáceas generan raíces de manera espontánea como *Opuntia spp.*, *Cephalocereus senilis*, *Coryphanta elephantides*, reduciéndose así el tiempo y los costos, debido probablemente que la producción interna de RCV de los regenerantes induce la formación de raíces .

Los reportes en donde se indique un tratamiento previo a la extracción de las plantas de las condiciones *in vitro* son escasos, Estrada-Luna y colaboradores reportan la reducción de sacarosa en el medio de cultivo para estimular el crecimiento en la fase de elongación, esto debido a que a una alta concentración de sacarosa y la presencia de algunos RCV inhiben el crecimiento (Lema-Ruminska y Kulus, 2014).

Ramírez-Malagón y colaboradores en 2007, realizaron un endurecimiento de plántulas de diez especies de *Mammillaria*, previo al establecimiento en suelo, en donde las plántulas se sacaron de las condiciones *in vitro* se les retiró el medio de cultivo de las raíces con agua corriente y se dejaron a la intemperie durante tres días, para que las raíces no se pudrieran, posteriormente se les sumergió en una solución con 492µM de IBA y fungicida para evitar problemas de enraizamiento, las plantas restauraron su crecimiento normal después de 3 o 4 semanas, todas las especies tuvieron más del 85% de sobrevivencia.

Para el género *Eucalyptus* se describieron varios procedimientos de endurecimiento de plantas generadas *in vitro*, todos basados en el principio de reducir gradualmente el nivel de humedad alrededor de las plantas y alterando su metabolismo de una dependencia parcial o a una independencia completa de la fuente externa de carbohidratos (Le Roux y Van Staden, 1991). La micropropagación de *Camelia sinensis* y su aclimatización tuvo algunos problemas que se superaron cuando se comprobó que la transferencia a un medio libre de RCV y una posterior inducción de raíces al igual que un aumento en el tamaño del recipiente donde se mantenían en incubación, y un aumento en las semanas (de 4 a 12) previas a la aclimatización, logró un aumento del 46% al 94% de supervivencia de las plantas (Bag, Palni y Nandi, 2019). El endurecimiento de las plántulas generadas *in vitro* es esencial para una mejor supervivencia y un establecimiento exitoso, la transferencia directa de plantas generadas en cultivo de tejidos a condiciones de invernadero o campo es complicada debido a la alta mortalidad de estos regenerados, debido a que se desarrollaron en un entorno de alta humedad, condiciones de luz específicas, temperaturas constantes, y protegidos del ataque de bacterias u hongos (Hiren *et al.*, 2004 citado en Deb y Imchen, 2010).

En el presente estudio, las pruebas de endurecimiento en condiciones *in vitro* dieron como resultado en promedio el 62.5% de sobrevivencia después de dos meses de que las plantas estuvieran en condiciones de invernadero, la prueba que dio el promedio más alto de sobrevivencia fue la reducción de sales en el medio al 25% (Gráf. 6).

Normalmente en las pruebas de aclimatización se reportan distintas combinaciones de sustratos, Fernández en 2014 reportó que para *B. militaris* se aclimatizó de manera efectiva en una mezcla de sustrato de: tepojal/tierra negra/tezontle/sphagnum/agrolita (4:2:2:1:1). Arellano-Perusquia y Estrada-Luna en 2012 reportaron la sobrevivencia de 90% de plantas aclimatizadas de *O. macdougallii* después de seis días en una mesa de trabajo con bajas condiciones de luz y después transferidas a una instalación con condiciones diferentes en humedad, intensidad lumínica, se evaluaron cambios y sobrevivencia, no reportaron que tipo de sustrato utilizaron.

Gaona en 2018 reportó el 75% de sobrevivencia de *A. asterias* después de dos meses de aclimatización, a las plantas aclimatizadas se les dio un periodo de aireación usando Sun-caps®, para aumentar la concentración de CO<sub>2</sub> mejorando el rendimiento fotosintético (Pospíšilova *et al.*, 1999).

Villavicencio y colaboradores en 2011 realizaron la aclimatización de *Turbinicarpus knuthianus* utilizaron tres tipos de sustratos (arena, peat moss y tierra negra), la combinación de éstos y además comprobaron el efecto de una cepa de *Azospirillum brasilense*, las plantas que fueron inoculadas registraron una supervivencia mayor al 91% independientemente del sustrato, para la especie en cuestión es recomendable el uso de un sustrato poroso, que su capacidad de retención de agua sea baja.

*Mammillaria plumosa* en cultivo *in vitro* no requiere de ningún tipo de RCV para la generación de raíces, ya que generaron raíces de manera natural a los 90 días de cultivo, pero al reducir el medio de cultivo a un cuarto de la concentración de sales se generará un mayor número de raíces, con tan solo cuatro semanas de cultivo (Tellez-Roman *et al.*, 2017). Los brotes de *Acanthocereus tetragonus* enraizaron de manera espontánea cuando se regeneraron en medio adicionado con BA (20, 30, 40, 50 y 60µM), al individualizar los brotes se les hizo un corte en la base del brote, es posible que ese corte haya estimulado la síntesis de auxina y causara el enraizamiento espontáneo (Cruz, 2020), mientras que en la presente investigación la producción de raíces ocurrió sin necesidad de realizar ese corte.

*Mammillaria hernandezii* generó raíces sin la adición de RCV, pero sí en un medio con carbón activado, a siete días de la individualización, con un 100% de brotes enraizados, después de un año de que los brotes enraizaron se realizó su aclimatización, se les realizó un periodo de deshidratación para prevenir la pudrición de raíces, después de seis meses de aclimatización de las plántulas se obtuvo un 100% de sobrevivencia, se utilizó una mezcla de tepojal, tierra negra, agrolita, *Sphagnum* y tezontle en proporción 5:3:1:1:1 (Pérez, 2015).

Mosco en 2012 realizó estudios de microscopia de luz, en cinco especies de cactus, los resultados indican la presencia de betacianinas, éstas se acumulan en la hipodermis y en las capas externas del clorénquima, donde pueden funcionar como pantalla, protegiendo los fotosistemas presentes en la capa subyacente, y así adquieren un color rojizo, esta coloración rojiza se observa en plantas en condiciones de invernadero en el proceso de aclimatización.

## Conclusiones

- El mejor medio para la regeneración de brotes de *O. macdougallii* es un medio nutritivo con bajas concentraciones de auxinas y citocininas (1.0/0.4 BAP/ANA mg/L).
- Debido, posiblemente, a la alta concentración endógena de auxinas presente en *O. macdougallii* para su propagación *in vitro* se puede prescindir del uso de reguladores de crecimiento, esto debido a que en el grupo control donde no se adicionaron RCV el número de brotes regenerados lo colocó en la posición número dos del total de brotes producidos.
- Para la generación de raíces en brotes de *O. macdougallii* no se requirió el uso de RCV, pero estas fueron efímeras, debido a que cuando se aclimatizaron se secaron y surgieron nuevas raíces.
- A altas concentraciones de RCV se generó un mayor número de brotes (Cuadro 2) muchos de ellos provenientes de tejido diferenciado (dermis o epidermis del explante) o de callo, pero la mayoría de éstos presentaron hiperhidratación y no generaron raíces.
- Una alta concentración de RCV generó brotes con una hiperhidratación evidente, que posteriormente estos brotes se convirtieron en callo, el cual es material vegetal que puede ser utilizado para futuras investigaciones.
- Después de seis meses de iniciada la inducción, el grupo que regeneró el mayor número de brotes que generaron raíz fue el grupo control con 70 brotes y un promedio de 11.6 brotes por explante.

- El tratamiento que generó el mayor número de plantas (individuos con sus dos ápices apical y radicular) fue el tratamiento 1 con 1.0/0.4mg/L de BA/ANA, con 60 plantas después de un año de haber iniciado la inducción.
- El número total de brotes enraizados fue de 150, correspondiente a un 56% del total de brotes regenerados.
- El tratamiento control promovió el mayor número de brotes consolidados, pero también presentó el menor porcentaje de brotes enraizados con el 34 este porcentaje bajo de brotes enraizados se puede deber probablemente a la influencia que tuvieron los RCV en la regeneración de brotes.
- La reducción de sales en el medio de cultivo previo a hacer la aclimatización de las plantas, dio como resultado un 90% de sobrevivencia, después de 8 semanas de que las plantas se encontraron en condiciones *ex vitro* (Cuadro 3).
- Se lograron determinar condiciones para la regeneración *in vitro* de *O. macdougalli* a partir de secciones de tallo de plántulas cultivadas *in vitro* con lo cual se plantea una alternativa viable para su conservación y planteamiento de alternativas de aprovechamiento sustentable

### **Perspectivas**

- La propagación *in vitro* de *O. macdougalli* se logra con concentraciones bajas de RCV, al usar bajos niveles de estas hormonas se obtienen buenos resultados, es recomendable dar un seguimiento más detallado y con mayor continuidad para obtener un mayor número de regenerantes y que estos tengan las características óptimas para su establecimiento *ex vitro*.

- El modificar las condiciones de cultivo *in vitro* previo a la aclimatización es un ensayo que debe de realizarse, para obtener mejores resultados y una mayor sobrevivencia de las plantas.
- EL aprovechamiento de los conocimientos y procedimientos desarrollados con la presente investigación, para la propagación y conservación de ésta y otras especies amenazadas, puede llegar a proveer plantas completas, salarios y empleo para personas encargadas de la producción, transporte y comercialización de plantas.
- El producir un número constante de plantas en cierto tiempo permite abastecer la demanda de plantas de coleccionistas o aficionados, reduciendo el impacto sobre las poblaciones naturales.
- Se pueden utilizar concentraciones elevadas de reguladores vegetales, acompañadas de algún tipo de osmorregulador, para que se reduzca la disponibilidad de agua, y con esto se prevenga la generación de brotes hiperhidratados.
- Con la reducción al 25% de sales minerales en el medio previo a la aclimatización se obtuvieron buenos resultados en la sobrevivencia de plantas, se podrían ensayar distintas concentraciones de sales para llegar a optimizar los procedimientos.
- El uso de la ciencia que es el CTV es una alternativa para tratar de reducir efectos del cambio climático provocados por la deforestación, cambios de uso de suelo, introducción de especies exóticas que se llegan a convertir en invasoras, el promover el uso de esta herramienta biotecnológica nos permitiría expandir nuestros conocimientos sobre la flora como una fuente de recursos naturales que presenten bienes comerciales atractivos al resto del mundo, además de una forma de protección de esta cactácea y de muchas otras plantas que ayudarían a

reducir el impacto que estamos provocando en el ambiente, para que esto se logre es necesario que se apoye a la investigación de nuevos jóvenes y se presenten oportunidades para desarrollar los conocimientos de manera profesional.

## Referencias

- Alexander, E. J. 1961. *Ortegocactus*, a unique new genus. *Cactus of Succulent Journal of the United States*, 33: 39-40.
- Anderson, E.F., Arias S. y Taylor N.P. 1994. Threatened cacti of Mexico. *Succulent Plant Research* 2:1-135.
- Anderson, E.F. 2001. The cactus family. Timber Press, Estados Unidos.
- Arellano-Perusquia, A. y Estrada-Luna, A. 2012 Micropropagation of *Ortegocactus macdougallii* Alexander, a Threatened Mexican Cactus. Conference: Southern Nursery Association: Research Conference., At Mobile, AL, USA., Volume: 57: 305-308.
- Arellano-Perusquia, A., López-Peralta M., Chablé-Moreno, F. y Estrada-Luna, A. 2013. Effect of growth regulators on the organogénesis and multiplication of *Ortegocactus macdougallii* Alexander. *Propagation of Ornamental Plants*. (13)4: 160-167.
- Armenteras, D., González, T.M, Vergara, L.K., Luque, F.J, Rodríguez, N., y Bonilla, M.A. (2016). Revisión del concepto de ecosistema como “unidad de la naturaleza” 80 años después de su formulación. *Ecosistemas*, 25(1),83-89. ISSN: 1132-6344. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54045357011>
- Bag, N., Palni, L. y Nandi, S. 2019. An efficient method for acclimatization: *in vitro* hardening of tissue culture-raised tea plants (*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze). *Current science*, Vol. 117, No. 2.
- Ballesteros-Barrera, C., Aguilar-Romero, O., Zarate-Hernández, R. y Ballesteros-Tapia, L. 2017. Distribución geográfica y conservación de nueve especies del género *Ferocactus* (Cactaceae) en México. *Fitotec*. Vol. 40 (2):131-140.

- Bárceñas, R. 2006. Comercio de Cactáceas Mexicanas y Perspectivas para su Conservación. *Biodiversitas*, 68, 11-15.
- Becerra, R. 2000. Las cactáceas, plantas amenazadas por su belleza. CONABIO. México. *Biodiversitas*. 32:1-5
- Bravo-Hollins, H. y Sánchez-Mejorada, H. 1991. Las cactáceas de México. 1ª edición. Volumen II. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 440pp.
- Braz de Oliveira, A., y De Fatima Pires Da Silva Machado, M. 2003. Alkaloid production by callous tissue cultures of *Cereus peruvianus* (Cactaceae). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 104(2), 149–155.
- Chen, T.H. y Murata, N. 2002. Mejora de la tolerancia al estrés abiótico mediante ingeniería metabólica de betaínas y otros solutos compatibles. Opinión actual en biología vegetal, 5(3),250-257. doi: [10.1016/s1369-5266 \(02\) 00255-8](https://doi.org/10.1016/s1369-5266(02)00255-8)
- CITES. 2017. Apéndices I, II y III de la CITES. <https://www.cites.org/esp/app/index.php>
- CITES. 2021. ¿Cómo funciona la CITES?. <https://cites.org/esp/disc/how.php>
- CITES. 2021. Apéndices I, II y III en vigor a partir del 14 de febrero de 2021. Recuperado de: <https://cites.org/sites/default/files/esp/app/2021/S-Appendices-2021-02-14.pdf>
- Cruz, S. 2020. Propagación *in vitro* de *Acanthocereus tetragonus* (L.) Hummelinck (Cactaceae). Tesis de Maestría. Universidad de Costa Rica. 93 pp.
- Deb, C.R. y Imchen, T. 2010. An efficient *in vitro* hardening technique of tissue culture raised plants. *Biotechnology* 9(1): 79-83.
- De la Rosa-Carrillo, M., Domínguez-Rosales, M.S., Pérez-Reyes, M.E. y Pérez-Molphe-Balch. 2012. Cultivo y propagación *in vitro* de cactáceas amenazadas del género *Turbinicarpus*. *Interciencia* 37(2): 114-120.

- Dirzo, R. y Mendoza, E. 2008. Biodiversity. En Jorgensen, E., y Fath, B. 2008. *General Ecology*. Encyclopedia of Ecology. Vol. 1 pp; 3678-377. Oxford: Elsevier.
- Durbak, A., Yao, H. y McSteen, P. 2012. Hormone signaling in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*. 15:92-96. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2011.12.004>.
- Espinosa-Reyes, A.L., Silva-Pupo, J.J., Pérez-Pérez, J.L. y Zambela, A.J. 2021. Efecto de las sales minerales y el uso de manitol en la conservación *in vitro* de *Morus alba* L. *Pastos y Forrajes*. 44: (20).
- Estrada-Luna, A., Martínez-Hernández, J.J., Torres-Torres, M.E. y Chable-Moreno, F. 2008. Micropropagation of an ornamental prickly-pear cactus (*Opuntia lanígera* Salms-Dyck) and effects of GA<sub>3</sub> on plant growth after transplantation. *Scientia Horticulturae* 117: 378-385.
- Fernández, M. 2014. Regeneración *in vitro* de *Backebergia militaris*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 113 pp.
- Fay, M.F. 1993. In what situation is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? *Biodiversity and Conservation*. 3:176-183.
- Gaona, A. 2018. Regeneración *in vitro* de *Astrophytum asterias* (Zucc.) Lem. Cactácea en peligro de extinción. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 106pp.
- Goettsch, B., Hilton-Taylor, C., Cruz-Piñon, G. *et al.* High proportion of cactus species threatened with extinction. *Nature Plants* 1, 15142. <https://doi-org.pbidi.unam.mx:2443/10.1038/nplants.2015.142>
- Goettsch, B.K. 2017. *Ortegocactus macdougallii*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*: e.T152228A121623136. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T152228A121623136.en>

- Gomes, F., Herdia, F., Facó, O. y Campos F. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). 108(1) 15-21  
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2005.12.007>
- Guzmán, U., Arias, S., y Dávila, P. 2003. Catálogo de Cactáceas Mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Hernández J. G., Chávez, R.J. y Sánchez, M. 2007. Diversidad y estrategias para la conservación de cactáceas en el semidesierto queretano. CONABIO. *Biodiversitas* 70:6-9.
- Hiren, Ap., Saurabh, R.M. y Subramanian, R.B., 2004. *In vitro* regeneration in *Curculigo orchioides* Gaertn. An endangered medicinal herb. *Phytomorphology*, 54: 85-95.
- Iliev, I. y Kitin, P. (2011). Origin, morphology, and anatomy of fasciation in plants cultured *in vivo* and *in vitro*. *Plant growth regulation*, 63: 115-129.
- Jackson M. B. (Ed.) (1986). New root formation in plants and cuttings. Developments in Plant and Soil Sciences Series. Vol. 20, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 265 pp.
- Jiménez-Sierra, C.L., Torres-Orozco, R. y Corcuera, P. 2010. Biodiversidad Una alerta. *Casa del tiempo*. 36:9-16 [En línea]  
[http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36\\_iv\\_oct\\_2010/casa\\_del\\_tiempo\\_eIV\\_num36\\_09\\_16.pdf](http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/36_iv_oct_2010/casa_del_tiempo_eIV_num36_09_16.pdf)
- Krainz, H. 1974. *Kakteen*. Ed. Stuttgart, República Federal de Alemania.
- Ketchum, R., Gibson D., Croteau R., Shuler ML. 1999. The kinetics of taxoid accumulation in suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotech Bioeng* 62:97-105
- Kutney, J.P., Arimoto, M., Hewitt, G.M., Jarvis, T.C. y Sakata, K. 1991. Studies with plant cell cultures of *Podophyllum peltatum* L. I. Production of podophyllotoxin,

deoxypodophyllotoxyn, podophyllotoxone and 4'-demethylpodophyllotoxin. *Heterocycle*, 32: 2305-2309.

Lema-Rumińska, J., Goncerzewicz, K. y Gabriel, M. 2013. Influence of Abscisic Acid and Sucrose on Somatic Embryogenesis in Cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma *mostruosa*. *The Scientific World Journal*, <https://doi.org/10.1155/2013/513985>

Lema-Rumińska, J. y Kulus, D. 2014. Micropropagation of Cacti—a Review. *Haseltonia* 19:46-63.

Le Roux, J.J. y Van Staden, J. 1991. Micropropagation and tissue culture of *Eucalyptus*—a review. *Tree Physiology*, 9: 435-477.

Loyola-Vargas V.M. y Ochoa-Alejo N., 2018. An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. En: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York, NY. [https://doi.org/10.1007/978-1-49398594-4\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-49398594-4_1).

Machado, M.F.P.D. y Prioli, A.J. 1996. Micropropagation of *Cereus peruvianus* Mill (Cactaceae) by areole activation. *In vitro Cellular Development. Biology-Plant* 32 (3): 199-203.

Mandujano, M., Montaña, C., Franco, M., Golubov, J. y Flores-Martinez, A. 2001. Integration of demographic annual variability in a clonal desert cactus. *Ecology*. 82: 344-359.

Mittermeier, R.A., C. Goettsch-Mittermeier y P. Robles Gil. 1997. Megadiversidad: los países biológicamente más ricos del mundo. Cemex-Agrupación Sierra Madre, México.

Mosco. A. 2012. Tissue localization of betacyanins in cactus stems. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, (83): 413-420.

- Murashige, T. y Skoog, F.C. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473-497.
- Nobel, P.S. (Ed.). 2002. *Cacti biology and uses*. University of California Press, Berkeley.
- Oldfield, S. (comp.). 1997. *Cactus and succulent plants-status survey and conservation action plan*. IUCN/SCC Cactus and Succulent Specialist Group. IUCN, Gland.
- Pérez, E., Pérez, M., Villalobos, E., Meza, E. Morones, L. Lizalde, H. 1998. Micropropagation of 21 species of cacti by axillary proliferation. *In vitro Cell, Dev. Biol.- Plant* 34: 131-135.
- Pérez, H. 2015. Propagación *in vitro* de *Mammillaria hernandezii*, cactácea endémica de México. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 77 pp.
- Pérez-Alonso, N. y Jiménez, E. 2011. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Biotecnología Vegetal*, 11(4). Recuperado de <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>
- Pilbeam, J., & Weightman, B. (2006). *Ariocarpus et cetera: the special, smaller genera of Mexican cacti*. British Cactus & Succulent Society.
- Pospíšilova, J., Tichá, I. Kadlec, P., Haisel, D. y Plzákova, S. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biologia Plantarum*, 42(4): 481-497.
- Quiala, E., Matos, J., Montalvo, G., de Feria, M., Chávez, M., Capote, A., Pérez N., Barbón, R. y Kowalski, B. 2009. *In vitro* propagation of *Pilosocereus robinii* (Lemaire) Byles et Rowley, endemic and endangered cactus. *Journal of the Professional Association for Cactus Development*. 11: 18-25.
- Rabinowitz, D., Caims, S. y Dillon, T. 1986. Seven kinds of rarity. In: Soulé, M.E. (ed.) *Conservation Biology*. Sinauer, Sunderland.
- Ramirez-Malagon, R., Aguilar-Ramirez, I., Borodanenko, A., Perez-Moreno, L. Barrera-Guerra, J.L., Nuñez-Palenius, H.G., Ochoa-Alejo, N. 2007. *In vitro* propagation of

ten threatened species of *Mammillaria* (Cactaceae). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43(6): 660-665. <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9076-z>

Ramírez, R. y Salazar, E. 2016. Propagación y conservación *in vitro* de siete especies de cactáceas del noreste del estado de Guanajuato. *Acta Universitaria*, 26(NE-2), 78-82. doi: 10.15174/au.2016.1540

Ramírez-Serrano, C. y Teixeira da Silva, J.A. 2008. Micropropagation of Cactus Plants (Cactaceae). En: Teixeira da Silva, J.A. (Ed.). *Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology V*(219-226). Kagawa, Japón: Global Science Books.

Reyes-Hernández, A.M.J. 2021. Control de la Hiperhidricidad y consolidación de brotes regenerados *in vitro* de *Mammillaria luethyi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ruvalcaba-Ruiz, D., Rojas-Bravo, D. y Valencia-Botín, A. J. 2010. Propagación *in vitro* de *Coryphanta retusa* (Britton & Rose) un cactus endémico y amenazado. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 12: 139-143.

Rzedowski, J., 2006. *Vegetación de México*. 1ra Edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, 504 pp.

Sala, F. y Labra, M. 2003. Somaclonal variation. En Thomas B, DJ Murphy, B Murray eds. *Encyclopedia Appl. Plant Sci*. Oxford, UK Academic Press Elsevier. 1417-1422.

Sánchez-Mejorada, H. 1982. Problemas en el control del comercio de las cactáceas. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*. 27:27-32.

Sánchez-Morán, M. R. y Pérez-Molphe-Balch, E. 2007. Propagación *in vitro* de *Browningia candelaris* (Cactaceae) usando metatopolina. *Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas*. 4(2):16:18.

- Sarukhán, J., *et al.* 2017. Capital natural de México. Síntesis: evaluación del conocimiento y tendencias de cambio, perspectivas de sustentabilidad, capacidades humanas e institucionales. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. SEMARNAT. CDMX, México. Publicada en el diario oficial de la federación el Jueves 30 de Diciembre del 2010.
- Skoog, F. y Miller, C.O. 1965. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Molecular and Cellular Aspects of Development*, E. Bell, ed., Harper and Row, New York: 481-494.
- Smith, R. H. (2013). *Plant tissue culture : techniques and experiments* (Third edition). Elsevier.
- Soberón-Mainero, J., Durand, L. y Larson-Guerra, J. 1995. Biodiversidad: conocimiento y uso para su conservación
- Soria-Campos, D., López-Escamilla, A. L., y Olguín-Santos, L.P. 2013. Propagación *in vitro* de *Mammillaria schiedeana schiedeana* (Cactaceae), subespecie endémica y amenazada de extinción de la Barranca de Metztitlán, Hidalgo. En: Pulido-Flores, G. y Scoot Monk (Eds.). Estudios científicos en el estado de Hidalgo y zonas aledañas, Volumen II (Lincoln, NE: Zea Books).
- Sosa , V., De-Nova, J. A., & Vásquez-Cruz , M. (2018). Evolutionary history of the flora of Mexico: Dry forests cradles and museums endemism. *Journal of Systematics and Evolution*, 56(5), 523-536. doi:doi: 10.1111/jse.12416
- Taiz, L. y Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal (vol. 2). Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I, D.LTéllez-Román, Janeth, López-Peralta, María Cristina

- Guadalupe, Hernández-Meneses, Eleodoro, Estrada Luna, Andrés Adolfo, Zavaleta Mancera, Hilda Araceli, & Livera Muñoz, Manuel. (2017). Morfogénesis *in vitro* de *Mammillaria plumosa* Weber. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 8(4), 863-876. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i4.13>
- Tóth Norbert, 2013. Myths and truths about *Ortegocactus macdougallii*. *Xerophilia*. Volumen 2, No. 4 (7) 71-77.
- Ulloa, C., Acevedo-Rodríguez, P., Becks, S., Belgranno, M., Bernal, R., Berry, P., Brako, L., Celis, M., Davidse, G., Forzza, R., Gradstein, R., Hokche, O., León, B., León-Yáñez, S., Magill, R., Neill, D., Nee, M., Raven, P., Stimmel, H., Strong, M., Villaseñor, J., Zarucchi, J., Zuloaga, F. Y Jorgensen, P. 2017. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science*. 358: 1614-1617.
- UICN, 2015. El Comercio ilegal contribuye a situar a los cactus entre las especies más amenazadas del mundo- Lista Roja de la UICN. Comunicado de prensa, consultado en <https://www.iucn.org/es/content/el-comercio-ilegal-contribuye-a-situar-a-los-cactus-entre-las-especies-mas-amenazadas-del-mundo-lista-roja-de-la-uicn>
- Velázquez, V. L. 2011. Cultivo *in vitro* de *Escontria chiotilla* y *Lemaireocereus hollianus* (Cactaceae). Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Vega. J. 2019. Regeneración *in vitro* de *Aztekium valdezii*, cactácea endémica de México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 90 pp.
- Verdi (2021) <https://verdi.mx/categoria-producto/cactus-y-suculentas/pchicas1/cactus/page/12/>
- Viñas M., Fernández-Brenes M., Azofeifa A., y Jiménez V. 2012. *In vitro* propagation of purple pitahaya (*Hylocereus costaricensis* [F.A.C. Weber] Britton & Rose) cv. Cebra. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*, 48(5), 469–477.

- Villaseñor, J.L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87:559-902}
- Villavicencio, E., Arredondo, A., Carranza, M., Mares, O., Comparan, S. y González, A. Cactáceas Ornamentales del Desierto Chihuahuense que se distribuyen en Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. México. pp 188
- Weightman, B. 2004. *Ortegocactus macdougallii*. *British Cactus and Succulent Journal*. 22: 69-71.
- Wilson, E. O. 1988. *Biodiversity*. National Academy Press, Washington, D. C. 521 p.
- Yáñez, M. 2011. Regeneración *in vitro* de *Mammillaria bombycina* Quehl (Cactaceae). Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 86 pp.

## Apéndice

**Apéndice A:** Composición del medio Murashige y Skoog pH 5.7 utilizado.

Componentes		MS 100% g/L	MS 25%	MS reducido en fuente de carbono	MS 25% y reducción de fuente de carbono
Macronutrientes	(NH <sub>4</sub> )NO <sub>3</sub>	1.65	0.4125	1.65	0.4125
	KNO <sub>3</sub>	1.9	0.475	1.9	0.475
	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.37	0.0925	0.37	0.0925
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.17	0.0425	0.17	0.0425
	CaCl <sub>2</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.44	0.11	0.44	0.11
Micronutrientes	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0.01689	0.0042225	0.01689	0.0042225
	ZnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0.0086	0.00215	0.0086	0.00215
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.0062	0.00155	0.0062	0.00155
	KI	0.00083	0.0002075	0.00083	0.0002075
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O	0.00025	0.0000025	0.00025	0.0000025
	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.000025	0.00000625	0.000025	0.00000625
	CoCl <sub>2</sub> *6H <sub>2</sub> O	0.000025	0.00000562	0.000025	0.00000625
FeEDTA	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.0278	0.00695	0.0278	0.00695
	Na <sub>2</sub> EDTA	0.0373	0.009325	0.0373	0.009325
Vitaminas	Tiamina	0.0001	0.000025	0.0001	0.000025
	Ácido nicotínico	0.0005	0.000125	0.0005	0.000125
	Piridoxina HCl	0.0005	0.000125	0.0005	0.000125
Inositol		0.10	0.025	0.10	0.025
Glicina		0.002	0.0005	0.002	0.002
Carbohidratos	Sacarosa	30	30	10	10
Agente Gelificante	Agar bacteriológico	8	8	8	8
Osmoregulador	Manitol	2	2	2	2